N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 6.315

THÈSE

DE DOCTORAT D'ÉTAT ES SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ PARIS VI

PAR

Alain GENTIL

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

SUJET DE LA THÈSE

EFFETS BIOLOGIQUES ET MÉTABOLISME DU 7,12-DIMÉTHYLBENZ (a) ANTHRACÈNE CHEZ LA SOURIS.

Soutenue le 26 Novembre 1971, devant la Commission d'Examen

MM. R. DAUDEL	**Président**
M. PASCAUD	**Examinateurs**
C. FRAYSSINET	**Examinateurs**
I. CHOUROULINKOV	**Membre invité**

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 6.315

THÈSE

DE DOCTORAT D'ÉTAT ES SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ PARIS VI

PAR

Alain GENTIL

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

SUJET DE LA THÈSE

EFFETS BIOLOGIQUES ET MÉTABOLISME DU 7,12-DIMÉTHYLBENZ (a) ANTHRACÈNE CHEZ LA SOURIS.

Soutenue le 26 Novembre 1971, devant la Commission d'Examen

MM. R. DAUDEL	**Président**
M. PASCAUD	**Examinateurs**
C. FRAYSSINET	**Examinateurs**
I. CHOUROULINKOV	**Membre invité**

UNIV.
LEIDEN
BIB.

THÈSE

DE DOCTORAT D'ÉTAT ÈS SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ PARIS VI

PAR

Alain GENTIL

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

SUJET DE LA THÈSE :

EFFETS BIOLOGIQUES ET MÉTABOLISME DU 7,12-DIMÉTHYLBENZ (a) ANTHRACÈNE CHEZ LA SOURIS.

Soutenue le 26 Novembre 1971, devant la Commission d'Examen

MM. R. DAUDEL		Président
M. PASCAUD	}	Examinateurs
C. PRAVOSSOUD		
I. CHOUROULINKOV		Membre invité

Je voudrais exprimer ma plus profonde gratitude à tous les Professeurs et Chercheurs qui se sont intéressés à ce travail.

A Monsieur le Professeur DAUDEL qui m'a fait le très grand honneur de bien vouloir accepter la Présidence de ce jury.

A Monsieur le Professeur M. PASCAUD et à Monsieur C. FRAYSSINET, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui ont bien voulu faire partie de ce jury et dont les suggestions ont été très appréciées.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543511_0014

Je suis particulièrement redevable à Monsieur I. CHOUROULINKOV, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui a guidé mes premiers pas de Chercheur et a su me communiquer son enthousiasme. Il a dirigé ce travail et sa constante sollicitude m'a été particulièrement précieuse. Je lui exprime ici ma plus sincère reconnaissance.

Je remercie Monsieur A. LWOFF, Directeur de L'Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, qui m'a permis de réaliser cette thèse.

Je remercie également Madame F. MAUGAIN qui s'est chargée du secrétariat, Madame S. AUDU et tous ceux dont l'amicale assistance technique a permis la réalisation de ce travail dans les meilleures conditions.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I - STRUCTURE DU DMBA 4

II - EFFETS BIOLOGIQUES DU DMBA 7

1°) - Toxicité aigue 7

2°) - Effets du DMBA en badigeonnage sur la peau ... 9

3°) - Effets du DMBA en injection sous cutanée 10

4°) - Effets du DMBA au niveau des poumons 11

5°) - Effets du DMBA à des niveaux divers 12

PREMIER CHAPITRE

EFFETS BIOLOGIQUES DU DMBA ADMINISTRE PAR VOIE ORALE 15

I - MATERIEL ET METHODE 16

II - RESULTATS 18

1°) - Administration massive par tubage gastrique unique 18

2°) - Administration à faible dose et à long terme.. 18

3°) - Aspect morphologique des tumeurs observées :.. 19

a) tumeurs gastriques 19

b) tumeurs mésentériques 21

.../...

III - DISCUSSION 23

DEUXIEME CHAPITRE

PENETRATION ET FIXATION DU DMBA AU NIVEAU DU TRACTUS DIGESTIF 28

I - MATERIEL ET METHODE 30

1°) - Technique de spectrophotométrie de scintillation 30

. administration orale du DMBA 31

. administration intraveineuse du DMBA ... 32

2°) - Technique d'autohistoradiographie 32

3°) - Extraction de l'ADN, l'ARN et des protéines de l'estomac et de l'intestin grêle 34

II - RESULTATS ET DISCUSSION..... 37

1°) - Pénétration-fixation du DMBA au niveau des différents organes du tractus digestif 37

2°) - Fixation du DMBA au niveau de constituants biochimiques 43

RESUME DES DEUX PREMIERS CHAPITRES 45

TROISIEME CHAPITRE

METABOLISME DU DMBA AU NIVEAU DU TRACTUS DIGESTIF 48

I - METABOLISME DU DMBA "IN VITRO"..... 52

.../...

A - MATERIEL ET METHODE 53

1°) - Synthèse des dérivés de référence..... 53

2°) - Traitement des animaux 57

3°) - Préparation des homogénats 57

4°) - Incubation des homogénats 58

5°) - Techniques de chromatographie et de spectrophotométrie de scintillation 61

6°) - Techniques de fluorométrie..... 61

7°) - Spectrophotométrie dans l'ultraviolet .. 63

B - RESULTATS 63

ETUDE A : Métabolisme du DMBA par des homogénats de foie, de préestomac, et d'intestin grêle

1°) - Métabolisme du DMBA par des homogénats de foie..... 63

2°) - Métabolisme du DMBA par des homogénats de préestomac, d'estomac glandulaire et d'intestin grêle 65

ETUDE B : Influence du temps d'incubation et de la stimulation "in vivo" sur le métabolisme "in vitro" du DMBA.

1°) - Influence du temps d'incubation 69

2°) - Influence de la stimulation par le 3-méthylcholanthrène 70

a) au niveau du préestomac 70

b) au niveau de l'estomac glandulaire . 70

c) au niveau de l'intestin grêle 71

C - DISCUSSION 72

II - METABOLISME DU DMBA "IN VIVO" 77

A - MATERIEL ET METHODE 77

B - RESULTATS 80

1°) - Elimination du DMBA de l'organisme 80

2°) - Distribution des métabolites dans les principaux organes du tractus digestif . 83

C - DISCUSSION 84

RESUME DU TROISIEME CHAPITRE 87

CONCLUSIONS GENERALES 90

BIBLIOGRAPHIE 96

Cette étude porte sur les effets biologiques, la fixation et le métabolisme du 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA) chez la souris.

INTRODUCTION

La première question que l'on peut se poser est la suivante : "Pourquoi avoir choisi l'étude d'une substance cancérigène plutôt qu'une autre ?" Pour répondre à cette question il faut tout d'abord définir ce qu'est un cancer. Il apparaît immédiatement qu'il est difficile d'en donner une définition générale tant les formes en sont variées. Il est classique cependant de dire que c'est une multiplication cellulaire anarchique, les cellules n'obeissant plus aux lois qui régissent la prolifération et le métabolisme cellulaire (Ch. OBERLING 1954). De ce fait la cellule cancéreuse est un matériel de choix pour tous les chercheurs qui s'intéressent à la vie, Biochimistes, Généticiens, Bactériologistes, Virologues et autres, et veulent en expliquer les principaux mécanismes. Il est bien connu en effet que l'abolition ou la déviation d'un mécanisme vital permet de mieux en saisir la compréhension. Certains hydrocarbures et en particulier

.../...

le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène sont des moyens très pratiques pour transformer une cellule et par là même pour permettre l'étude de ses fonctions les plus difficiles à approcher. Ceci était suffisant pour motiver le choix de cette substance.

On est en droit de se poser une seconde question : "Pourquoi le tube digestif ?" Il est très facile de répondre à cette question quand on se remémore que la pollution, sous toutes ses formes, est un des problèmes les plus préoccupants posés à notre civilisation. La pollution atmosphérique par exemple est un problème inquiétant non seulement par les risques pulmonaires qu'elle nous fait encourir mais surtout par la contamination qu'elle provoque de toute la biosphère : sol, eau, végétaux, animaux qui consomment ces végétaux et l'homme par conséquence. Or, cette contamination, essentiellement provoquée par les fumées d'usines, des raffineries pétrolières, des automobiles, du chauffage domestique etc ... agresse l'homme par deux voies principales : la voie pulmonaire et la voie digestive par l'intermédiaire de la nutrition. BAUER, cité par OBERLING en 1954, rappelant judicieusement que 2/3 de tous les cancers ont pour siège le tube digestif et ses glandes annexes, pense que le rôle de la nutrition dans l'étiologie des cancers aurait du attirer l'attention des chercheurs beaucoup plus qu'il ne l'a fait jusqu'ici. TRUHAUT (1963) pour sa part insiste surtout sur le fait que l'incorporation aux aliments de produits nocifs crée les conditions optimales pour les manifestations toxiques à long terme, principalement les effets cancérigènes.

.../...

L'introduction de ces produits chimiques nocifs dans l'alimentation humaine peut se faire de différentes façons : directement quand il s'agit de colorants destinés à présenter de façon plus alléchante un produit, même pharmaceutique, de substances assurant une meilleure conservation des aliments, des excipients aromatisés (le cyclamate est encore présent à toutes les mémoires) etc ..., ou indirectement quand il s'agit des animaux élevés à l'aide de produits synthétiques s'avérant d'un meilleur rendement, de l'utilisation massive des pesticides (rappelons à ce sujet l'emploi de l'acéthyl-amino-2-fluorène qui avait été envisagé en tant qu'insecticide et qui s'est avéré être un puissant cancérigène), de la pollution atmosphérique, et des contaminations de tous genres qui nous sont révélées journellement.

Rappelons également que certaines habitudes contribuent largement aux dangers que nous font courir certaines substances. Les japonnais, par exemple, en fumant leur poissons introduisent dans ceux-ci des doses considérables d'hydrocarbures (KURATSUNE et Coll 1966) : 16 hydrocarbures ont été détectés dans les dits poissons dont le 3,4 Benzopyrène. Enfin, il est à peine nécessaire de parler de dangers nés de l'habitude de fumer. Des dizaines de produits dangereux ont été isolés de la fumée de cigarette dont de nombreux hydrocarbures. Citons les plus connus : le 3,4 Benzopyrène, l'Anthanthrène, l'Azulène, le 1,2 Benzopyrène, le Phénanthrène, la Fluorène, l'Anthracène, le 1,2 Benzanthracène et ses nombreux dérivés cycliques ou méthylés, de nombreux

.../...

composés n'ayant pas encore été identifiés (WINDER and HOFFMAN (1967)). Selon SHABAD (1963) la recherche expérimentale de l'action cancérigène éventuelle de nouvelles substances chimiques introduites dans la vie humaine doit conduire à l'étude du mécanisme d'action des dites substances, de leur source, de leur circulation, de leur diffusion dans le milieu humain et des possibilités de détoxication.

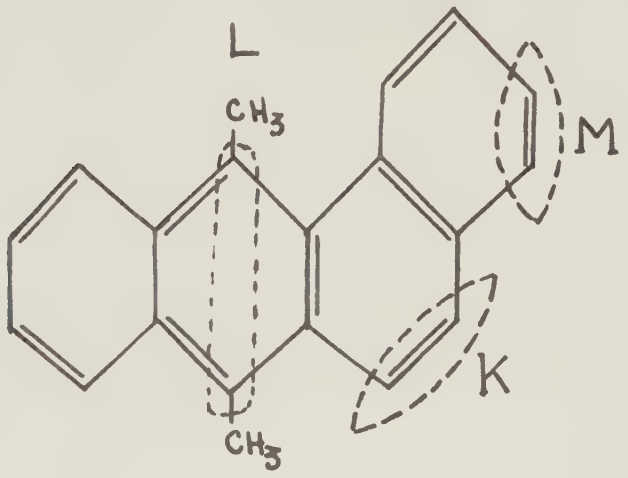
Un dernier problème enfin peut être posé : "Pourquoi le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène ?" Il est vrai qu'il n'a pas été mentionné précédemment comme un des produits que l'on retrouve fréquemment à l'état libre, mais il est un modèle de choix puisqu'il est un des hydrocarbures les plus actifs pour induire des transformations cellulaires.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier ses effets biologiques, sa fixation et son métabolisme dans le but de mieux comprendre les modifications qu'il subit dans l'organisme, en espérant qu'elles éclaireront certains mécanismes vitaux, enzymatiques entre autres, et qu'elles permettront de mieux connaître les possibilités et les potentiels virtuels de la cellule.

I - STRUCTURE DU DMBA

C'est un hydrocarbure aromatique à squelette benzanthracénique substitué en 7 et 12 par deux groupements méthyliques. Il se présente sous forme de paillettes jaune pâle dont le point de fusion est 122-123°C. Il est pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool, et très soluble dans le benzène et l'acétone.

Deux zones de la molécule sont particulièrement importantes en ce qui concerne son activité. D'après PULLMAN, son pouvoir cancérigène est en effet déterminé par une zone K très active et une zone L peu active.

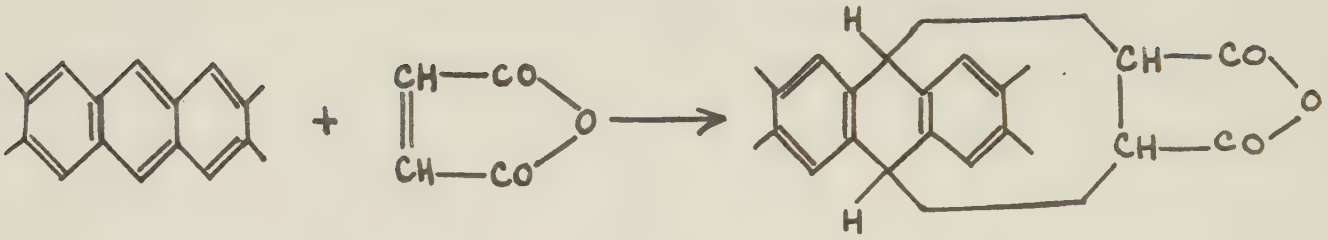


Une réaction entre la zone K et un récepteur cellulaire ne peut s'effectuer que si la zone L est assez inactive pour ne pas engager la molécule dans une action différente sans que la zone K ait eu le temps d'agir.

D'une façon générale la réactivité de la zone L se mesure par son aptitude à subir des additions cycliques (anhydride maléique, photooxydation) ou ouverte (tétraacétate de Pb, etc ...), celle de la région K par sa vitesse d'oxydation par le tétraoxyde d'osmium par exemple.

.../...

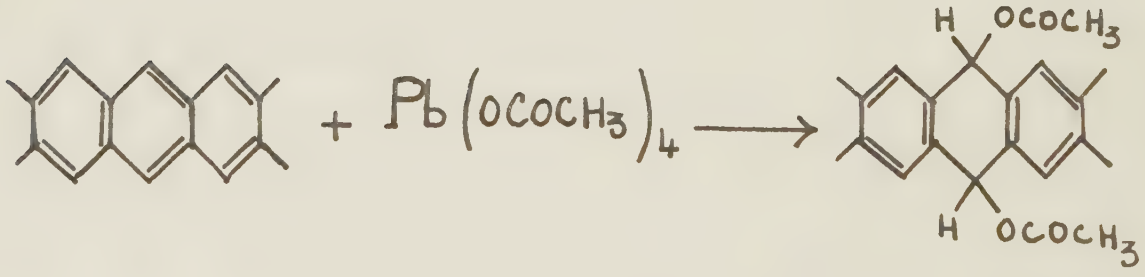
Réactionsd'addition cyclique :



avec l'anhydride maléique

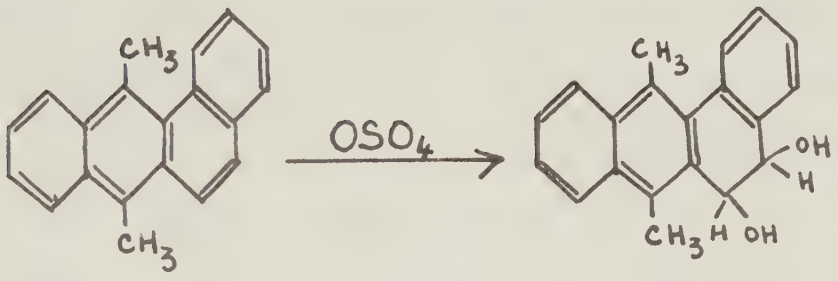
Photooxydation

Réaction d'addition ouverte :



avec le tétraacétate de plomb

Réaction d'oxydation par le tétraoxyde d'osmium :



Les groupements méthyl du DMBA ont pour conséquence de condenser les électrons sur le cycle et d'accentuer l'effet cancérigène en augmentant la charge de la zone K (le 7,12-DMBA est l'hydrocarbure cancérigène qui possède la charge la plus élevée sur la région K).

BOYLAND (1950) décrit cette zone K comme étant le carcinogénophore, responsable de l'induction de tumeurs, et la zone L comme étant l'auxocarcinogène, qui renforce l'activité de la zone K.

II - EFFETS BIOLOGIQUES DU DMBA SUR LES ORGANISMES

1°) - Toxicité aigüe

a) Toxicité générale

La toxicité à court terme du DMBA est assez grande, chez la souris tout au moins. Une injection intrapéritonéale de 0,75 mg à 3 mg de l'hydrocarbure provoque dans les 20 jours qui suivent une inflammation péritonéale accompagnée d'exsudats et

.../...

de dépression lymphocytaire dans le sang périphérique (SCHMIDT et Coll 1967). On note également chez ces animaux une perte de poids de la rate et du thymus. Il faut tenir compte toutefois du rôle joué par le solvant qui peut permettre une élimination plus ou moins rapide de DMBA ; en solution saline de tween 80 sa toxicité diminue.

TOTH et Coll (1966) ont mis en évidence qu'à poids égal les souris Swiss nouveau-nées sont plus sensibles aux effets toxiques de l'hydrocarbure que les souris Swiss adultes.

b) Toxicité spécifique chez le rat

Il a été montré par HUGGINS et MORTI en 1961 que le DMBA administré à des rats provoque une nécrose et une apoplexie des glandes surrénales, entrainant, si la dose est suffisante, la mort des animaux. Cet effet est particulier au DMBA et n'est pas obtenu avec les autres hydrocarbures tels le Benzopyrène ou le Méthylcholanthrène. De plus, il est spécifique au rat, de fortes doses de DMBA ne provoquant pas d'effets toxiques aigus sur les surrénales de souris (June MARCHANT 1967). Nous reviendrons sur ce phénomène mais nous pouvons déjà noter que certains hydrocarbures, même cancérigènes, ainsi que d'autres substances tel le phénobarbital, protègent le cortex surrénalien contre la nécrose massive (HUGGINS et Col 1963). Ces derniers, de même que WHEATLEY et Coll en 1966 ont mis en évidence que le DMBA devait être métabolisé pour léser les surrénales du rat. Nous verrons à propos du métabolisme du DMBA les hypothèses qui se rattachent à ce phénomène.

.../...

2°) - Effets du DMBA en badigeonnage sur la peau

Appliqué en badigeonnage sur la peau, le DMBA a montré une puissante action tumorigène chez un grand nombre d'animaux. La souris (BACHMANN et Coll 1938, IBALL 1939, ROE 1956, KLEIN 1956), le lapin (BERENBLUM 1945, LINELL et NORDEN 1950), le cobaye (EDCOMB et MITCHELIS 1961), le hamster (SHUBIK et Coll 1960) se sont révélés sensibles à son action.

Il a été possible de mettre en évidence une action cancérigène en deux temps en variant les conditions du badigeonnage (BERENBLUM 1941, BERENBLUM et SHUBIK 1947, SHUBIK 1950, SHUBIK et RITCHIE 1953, VESSELINOVITCH et GILMAN 1957). Le premier temps serait constitué par "l'initiation" et le second par la "promotion". La substance, dite cancérigène, "initierait" un certain nombre de cellules, c'es-à-dire, les transformeraient, mais celles-ci resteraient latentes. Des badigeonnages répétés d'un "promoteur", substance non cancérigène, telle l'huile de croton, forcerait les cellules transformées à se manifester donc à promouvoir la formation de tumeurs : papillomes ou épithéliomas. D'après BERENBLUM et SHUBIK (1949), une relation directe existerait entre la quantité d'initiateur utilisée et la réponse de la souris badigeonnée avec des doses croissantes de DMBA.

L'incidence des papillomes est cependant en rapport avec le mode d'application du DMBA. Une application de DMBA suivie d'applications répétées d'huile de croton induit une plus grande quantité de tumeurs bénignes, et moins de tumeurs

.../...

malignes que des applications répétées de DMBA seul (SHUBIK 1950) Tout comme le benzo(a)pyrène, le DMBA semble donc être à la fois initiateur et promoteur (RITCHIE et SHINOZUKA 1967).

Le temps d'induction est indépendant de la concentration d'hydrocarbure utilisée (ENGELBRETH-HOLM et IVERSEN 1951) mais est fonction de l'âge des animaux au début de l'expérience (ENGELBRETH-HOLM et JENSEN 1953).

En résumé, on peut dire que la plupart des animaux testés se sont montrés sensibles à l'action du DMBA appliqué par badigeonnages cutanés. Ils répondent par la formation de tumeurs bénignes (papillomes) ou malignes (épithéliomas).

3°) - Effets du DMBA en injection sous cutanée

Injecté par voie sous cutanée, le plus souvent en solution huileuse, le DMBA induit des tumeurs locales du tissu conjonctif du type sarcome. (ENGELBRETH-HOLM, SHEAR 1938 et LEFEVRE 1941)

L'incidence des tumeurs est fonction, d'une part, de la dose d'hydrocarbure utilisé et d'autre part de l'âge des animaux au moment du traitement. Ce phénomène est général et n'est pas spécifique au DMBA. La réponse tumorale augmente de façon linéaire avec le logarithme de la dose (BRYAN et SHIMKIN 1943), alors que le temps de latence est diminué (CHOUROULINKOV et Coll 1961). D'après TOTH et Coll (1963), l'incidence des sarcomes au site d'injection est d'autant plus grande que les animaux sont traités plus jeunes.

.../...

Les sarcomes obtenus par les hydrocarbures cancérigènes sont généralement des sarcomes fibroblastiques, présentant de nombreuses mitoses et facilement transplantables. Par contre ils ne donnent que peu de métastases (CHOUROULINKOV et Coll 1961).

4°) - Effets du DMBA au niveau des poumons

L'administration par voie cutanée, sous cutanée ou autre de DMBA à des souris de lignées susceptibles (SWISS, A/J par exemple) augmente l'incidence des tumeurs pulmonaires (adénomes) et accélère leur développement (WALTERS et ROE 1966, WALTERS 1966). Cependant, appliqué directement dans le poumon, le DMBA induit des tumeurs chez des souris non susceptibles et chez d'autres espèces de rongeurs, rats et hamsters, qui n'en présentent que rarement. Ainsi, après une injection de 0,5 mg de DMBA directement dans le poumon de souris street, RASK-NIELSEN (1950 a, 1950 b) a observé deux adénomes. Ces résultats confirmèrent ceux de ENGELBRETH-HOLM et RASK-NIELSEN en 1947. En 1958, DELLA-PORTA et Coll, après des instillations intratrachéales répétées de DMBA, ont obtenu, chez le hamster, des modifications de l'épithélium bronchique, des hyperplasies et des adénocarcinomes de la trachée et des bronches. HOWELL en 1961 a obtenu des carcinomes chez le rat par des instillations intranasales de DMBA en solution dans de l'huile d'olive. Administrés par voie intratrachéale, 2 à 10 mg de DMBA dans une suspension colloïdale d'infusine ont induit 30 % de lésions malignes chez des rats Wistar (SHABAD et PYLEV 1970).

.../...

5°) - Effets du DMBA à des niveaux divers

En plus des tumeurs locales, la plupart des auteurs ont obtenu des lésions "à distance" loin du site d'application du DMBA par badigeonnage, injection sous cutanée ou autre. C'est ainsi que des lymphomatoses, des lymphosarcomes, et des leucémies ont été obtenus, tant chez la souris (LOW 1941, RASK-NIELSEN 1949, 1950 c, RAPPAPORT et BARONI 1962, TOTH et Coll 1963) que chez le rat (HUGGINS et SUGIYAMA 1966, KURITA et Coll 1968) ou le hamster (TOTH 1969).

Un autre organe est très fréquemment atteint par le DMBA : la glande mammaire. HUGGINS et Coll (1961, 1963), SHIMKIN et Coll (1969), GUILLON et Coll (1970) obtinrent de nombreuses tumeurs mammaires chez le rat, même après une seule administration de DMBA en solution huileuse. Les tumeurs obtenues sont d'une histologie très variée. DANIEL et PRICHARD (1967) ont obtenu des adénomes secrétants ou non et des fibroadénomes. D'après HUGGINS et Coll (1966), l'incidence de ces tumeurs n'est pas modifiée par orchiectomie et hypophysectomie. Il semble donc qu'elles soient hormono - indépendantes.

De nombreux organes ont présenté des transformations, souvent malignes, consécutives à des administrations variées de DMBA.

BAUER et Coll (1950) de même que CHERRY et GLUCKMANN (1967) ont provoqué des sarcomes des glandes salivaires chez le rat, en injectant l'hydrocarbure directement dans la glande.

.../...

Des lésions de la cavité buccale du hamster ont également été signalées par SILBERMAN et SHKLAR en 1963 et SHKLAR en 1966, de même que des lésions cérébrales par IBLONOVSKAIA en 1960. HOWELL et Coll 1954 rapportent avoir provoqué 53 tumeurs ovariennes chez 88 souris femelles, en plus des carcinomes mammaires. MARCHANT en 1961, JULL et Coll en 1966 ont également induit de telles lésions avec le DMBA. FORD et HUGGINS en 1963 ont noté une atrophie testiculaire par destruction de la lignée germinale, les cellules interstitielles étant indemnes, consécutive à une ingestion ou une injection intraveineuse de DMBA.

La liste des effets biologiques de cet hydrocarbure pourrait être considérablement allongée et elle est loin d'être close. Elle sera complétée dans le chapitre suivant par ses effets sur le tube digestif, qui ont constitués la première partie de notre travail.

PREMIER CHAPITRE

EFFETS BIOLOGIQUES DU DMBA ADMINISTRE PAR VOIE ORALE

Le tube digestif a été l'objet de nombreuses études, BERENBLUM et HARAN en 1955 (a) obtinrent 47 % de papillomes du préestomac après 30 semaines de latence, par une ingestion de 0,3 ml de DMBA à 0,5 % dans du polyéthylène glycol 400, chez des souris Swiss et C_3H. Le premier papillome est apparu au bout de 4 semaines. Le pourcentage de papillomes atteignait 100 % après 6 injections chez les C_3H, la plupart des lésions devenant malignes. Par contre BERENBLUM (1955 b) pas plus que SAXEN et Coll (1950 a, 1950 b) ou SAXEN (1952) n'obtinrent de lésion de la partie glandulaire de l'estomac. Cette partie de l'estomac s'est toujours montrée réfractaire à l'action des hydrocarbures administrés oralement, comme à celle de nombreuses autres substances. Nous verrons en détail plus loin les interprétations que l'on peut donner à ce propos. Des tumeurs de la partie glandulaire ont cependant été obtenues par l'intermédiaire de différents artifices : HOWES et de OLIVIERA (1958), par exemple, en implantant des fils de soie imprégnés d'hydrocarbure (3-méthylcholanthrène) directement dans la muqueuse gastrique. GRANT-RHODA (1966) a également obtenu la cancérisation de la partie glandulaire de l'estomac par l'implantation de cristaux de DMBA dans la muqueuse même, chez des rats.

Pour notre part nous avons choisi de rester le plus près possible des conditions physiologiques naturelles, le but de notre travail n'étant pas d'obtenir la cancérisation de

.../...

l'estomac. Celle-ci nous permet cependant de mettre en parallèle les effets biologiques du DMBA avec sa fixation et son métabolisme au niveau du tube digestif.

I - MATERIEL ET METHODE

Pour tester les effets biologiques du DMBA par voie orale deux modes d'administration ont été utilisés : administration par tubage gastrique et administration par incorporation de la substance au régime.

Administration par tubage gastrique :

Les animaux, à jeûn de la veille, ont reçu par l'intermédiaire d'un tube souple en polyéthylène 0,4 ml d'une solution de DMBA à 0,5 % dans de l'huile d'olive (Codex). Les souris ont ainsi ingéré en une seule et unique dose, 2 mg d'hydrocarbure. Pour cette expérience deux lignées de souris ont été employées : des souris albinos ICI (Impérial Chemical Industries Macclesfield, Cheschire - Angleterre) et des souris AHe. Ceci permettait de contrôler le facteur souche. Les souris, des deux sexes étaient âgées de 2 à 3 mois au moment du tubage. Elles ont été ensuite sacrifiées 3, 4, 5 ou 6 mois après l'administration du DMBA pour une étude anatomopathologique.

Administration par incorporation du DMBA au régime :

Le second mode a consisté en l'administration du DMBA (Laboratoire ROCHE) incorporé dans le régime. A titre de comparaison, un lot de souris a reçu de la même façon du

.../...

3,4 benzopyrène (Hoffman La Roche) au lieu du DMBA. Pour ce faire 300 mg de DMBA ou 400 mg de benzopyrène préalablement dissous dans deux litres d'huile d'olive (Codex) ont été incorporés à 100 Kg d'un régime ordinaire pour souris (U.A.R. N° 1.02) avant la fabrication des comprimés. Si nous admettons qu'une souris consomme environ 5 g de régime par jour, elle absorbera en même temps 15 µg de DMBA et 20 µg de benzopyrène. Pour une durée d'expérimentation de 14 mois, la dose totale absorbée sera donc d'environ 6 mg pour le DMBA et 8 mg pour le benzopyrène. Deux lots expérimentaux témoins ont été constitués, le premier recevant le régime U.A.R. N° 1.02 seul, le second le même régime additionné de 2 litres d'huile d'olive (Codex) pour 100 Kg. Dans cette expérience des souris ICI femelles ont uniquement été utilisées. Elles ont été reçues dans le laboratoire à l'âge de 30 jours, mais l'expérience n'a débuté que quand elles furent âgées de 70 jours ($\pm$ 5 jours). La répartition par cages de 10 souris et par traitement a été effectuée selon un plan de distribution statistique (au hasard).

Tous les animaux, morts ou sacrifiés, ont été autopsiés et les organes présentant une anomalie macroscopique ont été prélevés puis fixés par le liquide de Bouin en vue d'une étude histologique. Les lames ont été préparées selon la technique histologique de routine : inclusion à la paraffine, coupe, et coloration à l'hématéine-éosine-safran.

.../...

II - RESULTATS

1°) - Administration massive par tubage gastrique unique

Les animaux disparus ou morts avant l'apparition de la première lésion tumorale ont été éliminés. Le tableau I montre qu'un seul type de lésion a été obtenu. Il s'agit de proliférations épithéliales siégeant au niveau du préestomac sous forme de papillomes, l'estomac glandulaire étant indemne. Il n'a pas été noté de différence significative liée au sexe ou à la lignée de souris utilisée .

2°) - Administration par le régime à faible dose et à long terme

Deux lots expérimentaux identiques comprenant chacun 80 souris ont été constitués. L'expérience a été poursuivie 14 mois, mais dès le 170e jour les animaux traités par le DMBA ont commencé à mourir d'un syndrome hémorragique péritonéal. De ce fait, les animaux disparus ou morts avant le 160e jour ont été éliminés. Le taux de souris éliminées dans le lot recevant le DMBA s'élève à 10 % tandis qu'il est négligeable dans les autres lots.

Deux types de lésions ont été observées (Tableau II) : des tumeurs gastriques et des tumeurs localisées dans le mésentère, ces dernières étant responsables du syndrome hémorragique péritonéal entrainant la mort des animaux.

a) Les tumeurs gastriques : elles ont presque toutes été trouvées au moment du sacrifice des animaux traités avec le 3,4 benzopyrène, ce qui indique que les premières lésions,

.../...

compte tenu de leur développement, commencent vers le 400e jour après le début du traitement. Les autopsies des animaux traités avec le DMBA, morts avant la date du sacrifice ont permis de situer l'apparition de ces tumeurs vers le 360e jour. Il est probable que leur incidence générale aurait été plus élevée et leur malignité accrue, si l'expérience avait été poursuivie plus longtemps. La mortalité élevée causée par l'autre type de tumeurs dans le lot expérimental recevant le DMBA nous a contraint à interrompre l'expérience.

b) Les tumeurs mésentériques : l'autopsie a révélé des tumeurs de taille variable, de quelques millimètres à trois centimètres, localisées dans le mésentère de l'intestin grêle. D'aspects hémorragiques, le ganglion mésentérique et le pancréas étaient directement touchés. Cependant, ces tumeurs restaient bien localisées, les intestins, les reins, la rate et le foie étant indemnes (fig. 1 A et B). Dans un seul cas une métastase pulmonaire a été trouvée. (fig. 6 - B).

3°) - Aspect morphologique des tumeurs observées

a) Tumeurs gastriques : Dans un travail de base, STEWART et LORENZ (1949) ont bien décrit la morphologie de ce type de tumeur. A l'autopsie, le préestomac, dont l'épithélium est de type malpighien, présente une ou plusieurs formations tumorales saillantes de tailles variables appelées : papillomes. La souplesse de la paroi de l'organe est toujours sauvegardée. Dans le cas

.../...

ou cette paroi est épaissie et devient rigide, il s'agit non plus d'un papillome, mais d'une tumeur maligne, infiltrante. Ces papillomes sont généralement blanchâtres et friables. Cette friabilité est due à une hyperkératinisation.

Histologiquement les tumeurs du préestomac sont classées en trois catégories : papillomes, papillomes en voie de transformation maligne, et épithéliomas.

Les papillomes (fig. 2), tumeurs bénignes, résultent essentiellement de la prolifération d'un territoire épithélial entrainant un épaississement et des plissements. Ces tumeurs sont de taille variable, largement implantées ou rétrécies à la base (papillomes en nappe ou papillomes pédiculés). Toutes les couches de l'épithélium sont en général hyperplasiques.

Les papillomes en transformation maligne (fig. 3, A et B) ou papillomes ombiliques (STEWART et LORENZ 1949) sont des papillomes dont le sommet est ulcéré, creusé. Les cellules épithéliales de la couche basale, du type germinatif connencent à proliférer vers la profondeur et infiltrent le chorion tout en changeant d'aspect. D'après STEWART et LORENZ, l'ulcération entraine l'exposition des cellules basales à l'hydrocarbure et provoque leur transformation. On peut toutefois penser que c'est la membrane basale (limite entre l'épithélium et le chorion), toujours intacte dans les papillomes, qui empêche l'envahissement des couches profondes par les cellules épithéliales prêtes à le

.../...

faire. L'ulcération avec son processus inflammatoire infiltrant entraine alors la rupture de cette basale et permet la prolifération dans toutes les directions.

Les épithéliomas (Fig. 4 - A, B, C) sont de type malpighien ayant pour point de départ un papillome ou une hyperplasie épithéliale. Toutefois quand ces épithéliomas sont bien développés il est très difficile d'en déterminer l'origine exacte. Ils se caractérisent pas une infiltration du chorion et de la couche musculaire de l'estomac, celle-ci pouvant atteindre 0,5 à 1 cm d'épaisseur (fig. 4 A). Ces épithéliomas sont susceptibles de donner des métastases. Nous n'avons pas observé de telles métastases à distance, les animaux ayant été sacrifiés précocement. Dans ces épithéliomas les cellules sont de type malpighien et forment des masses homogènes ou des "globes cornés".

Les trois formes ci-dessus mentionnées peuvent se présenter isolément ou associées. Sur 41 souris traitées au régime contenant du DMBA, et ayant développé des tumeurs gastriques, 31 avaient uniquement un ou plusieurs papillomes, 6 des papillomes en transformation maligne et 4 des épithéliomas. Les souris ayant ingéré le régime au benzo(a)pyrène n'ont présenté que des papillomes.

b) - Tumeurs mésentériques : Histologiquement, il s'agit d'hémangio-endothéliomes malins très polymorphes (fig. 5 A et B). En effet, on peut voir des aspects d'hémangiomes capillaires ou caverneux dont la rupture provoque l'hémorragie

.../...

mortelle. Certains foyers tumoraux présentent une prolifération endothéliale, massive par endroits, dont les cellules conservent souvent un noyau régulier, mais elles peuvent prendre des aspects histiocytaires ou devenir géantes (fig. 6, A) avec un cytoplasme abondant et des noyaux monstrueux ou multinucléés (jusqu'à 25 noyaux) du type plasmodial. D'autres zones peuvent prendre une structure en tourbillon rappelant celle d'un fibrosarcome. Dans quelques cas nous avons noté l'apparition de corps d'inclusion cytoplasmiques, fortement éosinophiles, surtout arrondis, de taille très variable, qui nous ont paru en rapport plus avec un trouble du métabolisme cellulaire qu'avec une lésion due à la présence d'un virus.

Le plus souvent le point de départ de la tumeur semble être le tissu conjonctivo-graisseux du mésentère aux alentours du pancréas et des ganglions mésentériques. Mais la tumeur peut débuter en plein ganglion ou dans le pancréas. De toutes façons, au cours de l'évolution de la tumeur, ces deux organes sont envahis, disséqués et détruits (fig. 7 A et B) ; aucune délimitation histologique n'est plus possible. Les ilôts de Langerhans situés en plein tissu tumoral, semblent résister en s'hypertrophiant (fig. 7, A). Très souvent on peut voir des foyers lymphoplasmocytaires, vestiges de ganglions lymphatiques ou conséquences d'une réaction métaplasique du tissu graisseux du mésentère ; plus rarement existe une infiltration d'éléments myéloïdes, avec dans quelques cas des myéloplaxes, qui peuvent faire penser à une métaplasie myéloïde.

.../...

III - DISCUSSION

Deux faits importants, en rapport avec le mode d'ingestion du DMBA sont à souligner. Ce sont, le temps de latence pour l'apparition des tumeurs gastriques, beaucoup plus élevé quand l'hydrocarbure est incorporé au régime, ainsi que leur fréquence relativement faible, et la formation de tumeurs mésentériques qui n'apparaissent pas avec un tubage unique de DMBA. On peut noter également que le benzo(a)pyrène incorporé au régime n'induit pas ce second type de tumeur.

Le faible pourcentage de lésions gastriques obtenues avec le DMBA mélangé au régime et leur apparition tardive peuvent facilement s'expliquer par la faible dose d'hydrocarbure qui entre réellement en contact avec la muqueuse gastrique. Celui-ci se trouve intimement mélé aux constituants du régime et l'on peut penser que la quantité de DMBA qui entre en contact direct avec la paroi stomacale et peut agir à son niveau, est moindre que celle incorporée dans le régime. Il a en effet été rapporté (Tableau I) que l'hydrocarbure administré dans l'estomac vide, le contact substance-muqueuse étant parfaitement réalisé, provoquait jusqu'à 64 % de papillomes du préestomac chez des souris Anglaises femelles, 6 mois seulement après une instillation de DMBA.

Les tumeurs mésentériques présentent davantage d'intérêt du fait qu'elles sont uniquement obtenues avec le DMBA et qu'elles sont assujetties à une administration à faible

.../...

dose et à long terme de la substance. En effet le benzo(a)pyrène n'a pas induit ce type de tumeurs, de même que l'uréthane administré dans de l'eau de boisson à 0,2 % pendant 6 mois (CHOUROULINKOV, résultats non publiés).

Dans la littérature il n'a été relevé que deux publications signalant des angio-endothéliomes à localisation mésentérique : une de WHITE et STEWART en 1942 et une de LORENZ et STEWART en 1947. Dans des conditions analogues aux nôtres, WHITE et STEWART ont administré pendant 6 mois à des souris, du 20-méthylcholanthrène à raison de 1 mg par jour, mélangé à un régime ordinaire. Ils ont obtenu des tumeurs mésentériques chez 22 % des souris C_3H et 60 % des souris C traitées. Au cours de la même expérience du 1,2,5,6-dibenzanthracène n'a pas induit ce type tumoral. Ce n'est qu'en 1947 que LORENZ et STEWART, dans le même laboratoire, ont obtenu des tumeurs mésentériques avec une émulsion de 1,2,5,6-dibenzanthracène administré dans l'eau de boisson pendant plusieurs mois (140 à 280 jours). D'autre part l'administration de DMBA par tubage, incorporé dans du saindoux ou de la paraffine, en émulsion aqueuse dans l'eau de boisson, ou injecté directement dans la paroi de l'estomac, n'a induit que des modifications cellulaires du préestomac ou de l'intestin grêle, aucune lésion mésentérique n'a été observée. L'administration lente et continue de l'hydrocarbure semble donc être un facteur déterminant.

Un autre facteur, mis en évidence par LORENZ et STEWART (1948) est le facteur solvant. Quand ils ont utilisé de l'huile

.../...

d'olive pour préparer leur émulsion de dibenzanthracène ils ont obtenu uniquement des tumeurs mésentériques ; par contre quand ils ont employé une huile minérale ils n'ont induit que des tumeurs intestinales. L'huile minérale n'est que très peu atteinte par la digestion si bien que la substance cancérigène n'est, ni absorbée, ni métabolisée, et qu'elle est entrainée plus loin dans les intestins, d'où l'induction de tumeurs intestinales et l'absence de tumeurs mésentériques.

Cette hypothèse très vraissemblable n'explique cependant pas si le DMBA est absorbé inchangé ou métabolisé par le tube digestif ou la flore intestinale. Plusieurs raisons font penser que c'est un métabolite formé lors du transit du DMBA dans le tube digestif qui est responsable des transformations angio-endothéliales. La première est que des injections intrapéritonéales n'induisent pas de tumeurs mésentériques (MARCHANT et Coll 1954). La seconde est que BOYLAND et SIMS en 1965, ayant montré que le DMBA était métabolisé in vitro par des préparations de foie, il est donc possible qu'il le soit également par l'intestin. De plus ces mêmes auteurs, en 1967, ainsi que d'autres dont il sera fait mention dans les chapitres suivants, ont mis en évidence que le métabolisme des drogues ("sensulato"), pouvait être augmenté de façon substantielle dans certaines conditions. Nous reviendrons plus tard en détail sur ce phénomène, mais on peut admettre d'emblée que l'administration continue de l'hydrocarbure augmente et modifie sensiblement son propre métabolisme. Il est donc possible qu'un métabolite possédant des propriétés particulières,

.../...

lipotropes par exemple, actif au niveau de la graisse mésentérique soit produit. ANDERVONT et GRADY (1942) ont insisté sur une telle propriété de l'O-amino-azotoluène qui, injecté par voie sous cutanée, induit des angio-endothéliomes exclusivement dans les régions riches en graisses. Sur 71 cas ils en ont observé 47 dans la zone interscapulaire, 11 dans la graisse sous cutanée, 7 dans la graisse du mésentère, etc ...

Si métabolite actif il y a, celui-ci peut également résulter du métabolisme de la flore intestinale. SHABAD, 1966 ayant montré que des bactéries du sol métabolisaient le benzo(a)pyrène et ayant même sélectionné des souches bactériennes en métabolisant de grandes quantités.

Deux problèmes se posaient donc clairement, celui de l'absorption du DMBA administré oralement et son métabolisme dans le tractus digestif. Ces problèmes sont l'objet des chapitres suivants. Le premier étudie la pénétration et la fixation du DMBA et le second le métabolisme in vitro et in vivo de l'hydrocarbure au niveau du tractus digestif.

TABLEAU I - TUMEURS GASTRIQUES OBTENUES AVEC LE DMBA ADMINISTRE PAR TUBAGE GASTRIQUE.

Souches utilisées	Sexe des souris	Date du sacrifice (en mois après tubage).	Nombre de souris en expérience	Nombre de souris retenues	Nombre de souris avec tumeurs
SOURIS ICI	Mâles	3 mois	20	19	6/19 - 34 %
		4 mois	20	18	7/18 - 39 %
		6 mois	20	14	9/14 - 64 %
	Femelles	3 mois	20	16	3/16 - 19 %
		4 mois	60	48	18/48 - 37 %
SOURIS AHE	Mâles	5 mois	20	19	5/19 - 26 %
	Femelles	4 mois	20	20	3/20 - 15 %

TABLEAU II - TUMEURS OBTENUES AVEC LE DMBA ET LE BP ADMINISTRES A FAIBLE DOSE ET A LONG TERME (14 MOIS) INCORPORES AU REGIME

REGIME	NOMBRE	SERIE I	SERIE II	TOTAL
Régime Normal + DMBA	Souris retenues	75	69	144
	Tumeurs gastriques	20	21	41 (28 %)
	Tumeurs mésentériques	49	50	99 (69 %)
Régime Normal + 3,4 BP	Souris retenues	81	79	160
	Tumeurs gastriques	5	8	13 (8 %)
	Tumeurs mésentériques	-	-	-
Régime Normal + huile d'olive	Souris retenues	40	77	117
	Tumeurs gastriques	-	-	-
	Tumeurs mésentériques	-	-	-
Régime Normal	Souris retenues	81	77	158
	Tumeurs gastriques	-	-	-
	Tumeurs mésentériques	1	-	1

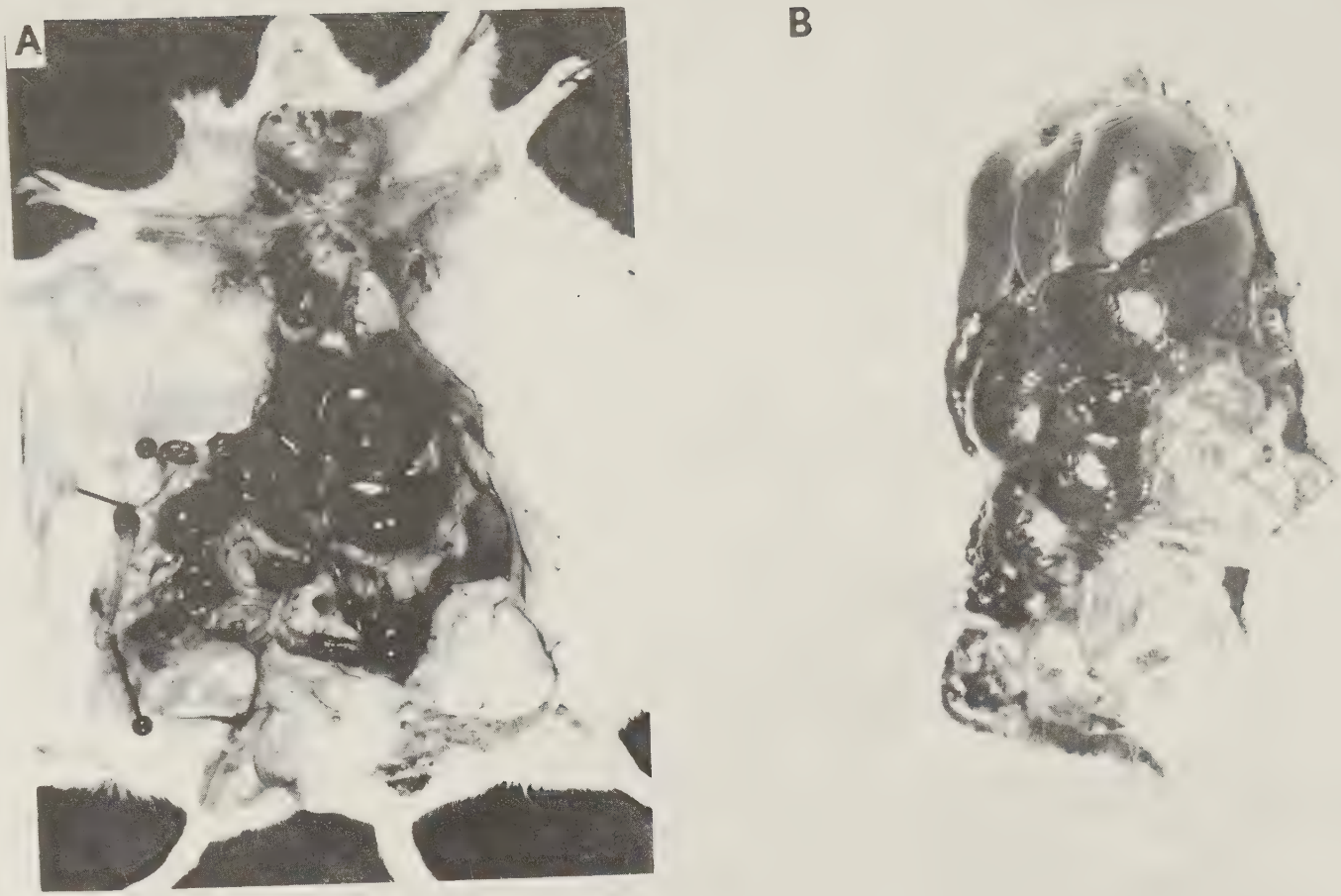


Fig. 1

Tumeurs mésentériques, multifocale (A) et multilobulée (B), d'aspects hémorragiques. La rate est hypertrophiée mais non tumorale.

Fig. 2

Papillome du préestomac typique, pédiculé.

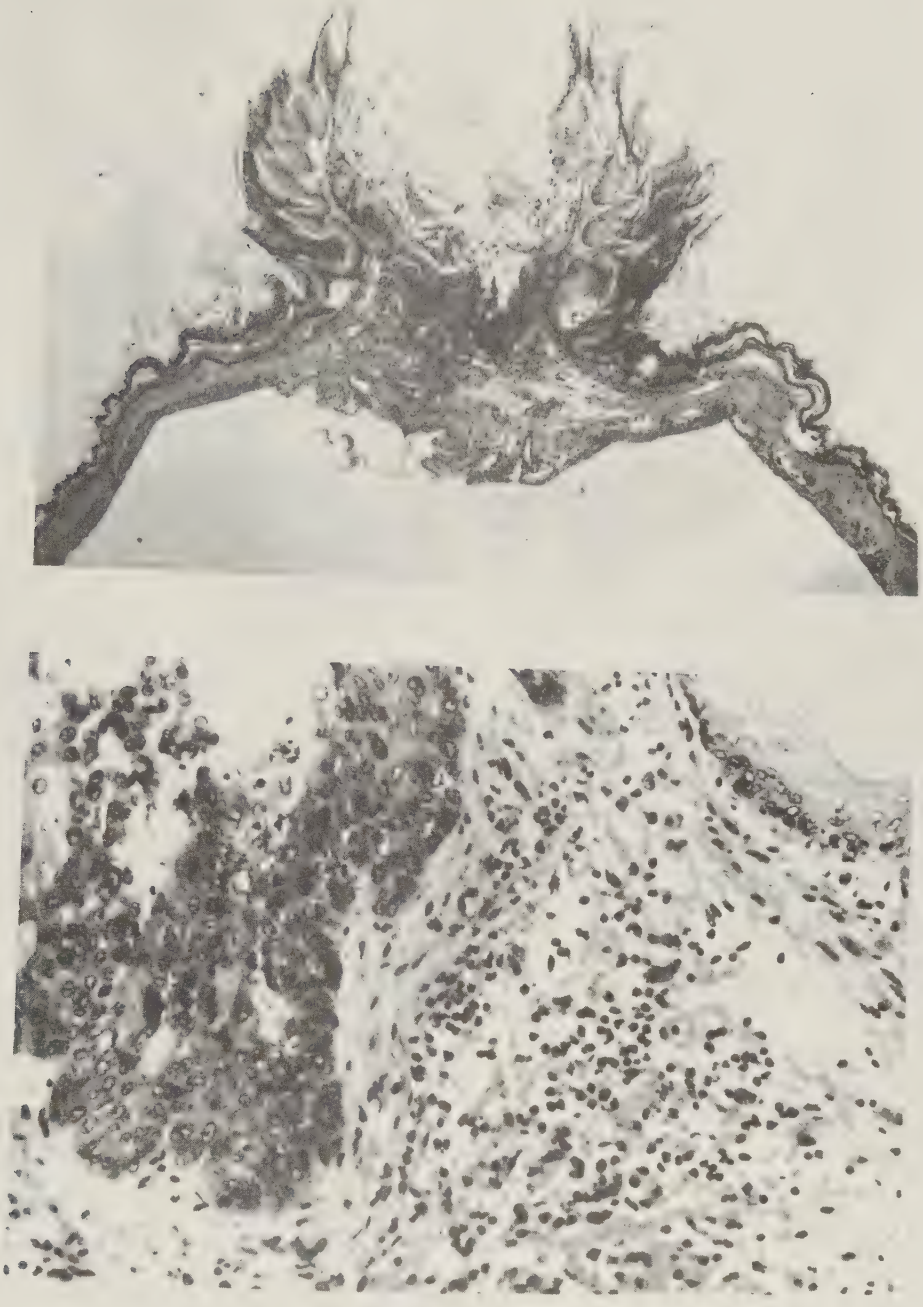


Fig. 3

A - Papillome gastrique ombiliqué en transformation maligne dont la zone centrale est ulcérée.

B - Détail de la zone ulcérée avec cellules malignes (à gauche).

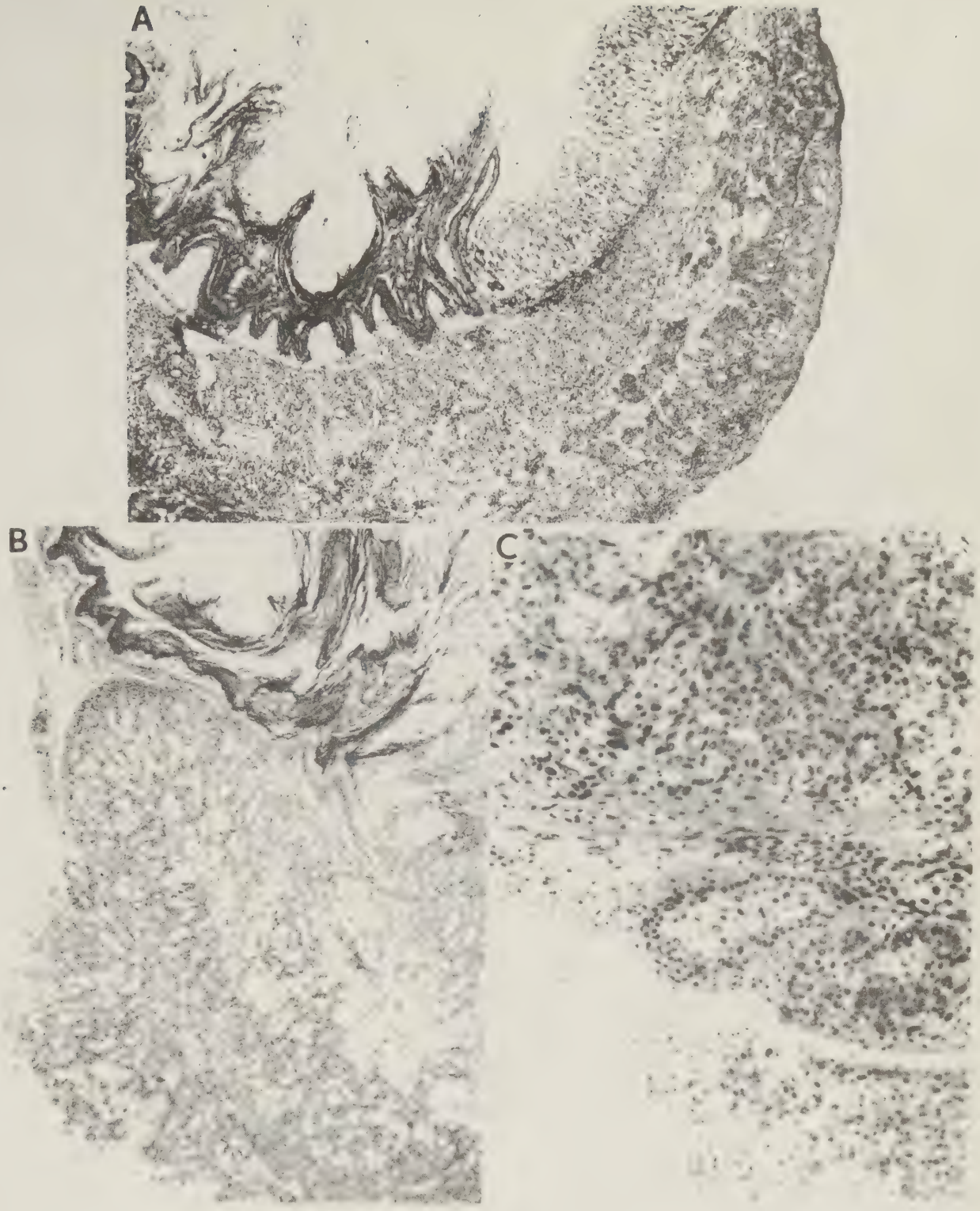


Fig. 4

A - Papillomatose du préestomac (à gauche) et épaississement de la paroi par infiltration épithéliomateuse.

B - Epithélioma malpighien du préestomac (à partir d'un papillome) le chorion et le muscle sont envahis.

C - Détail de B en fort grossissement.

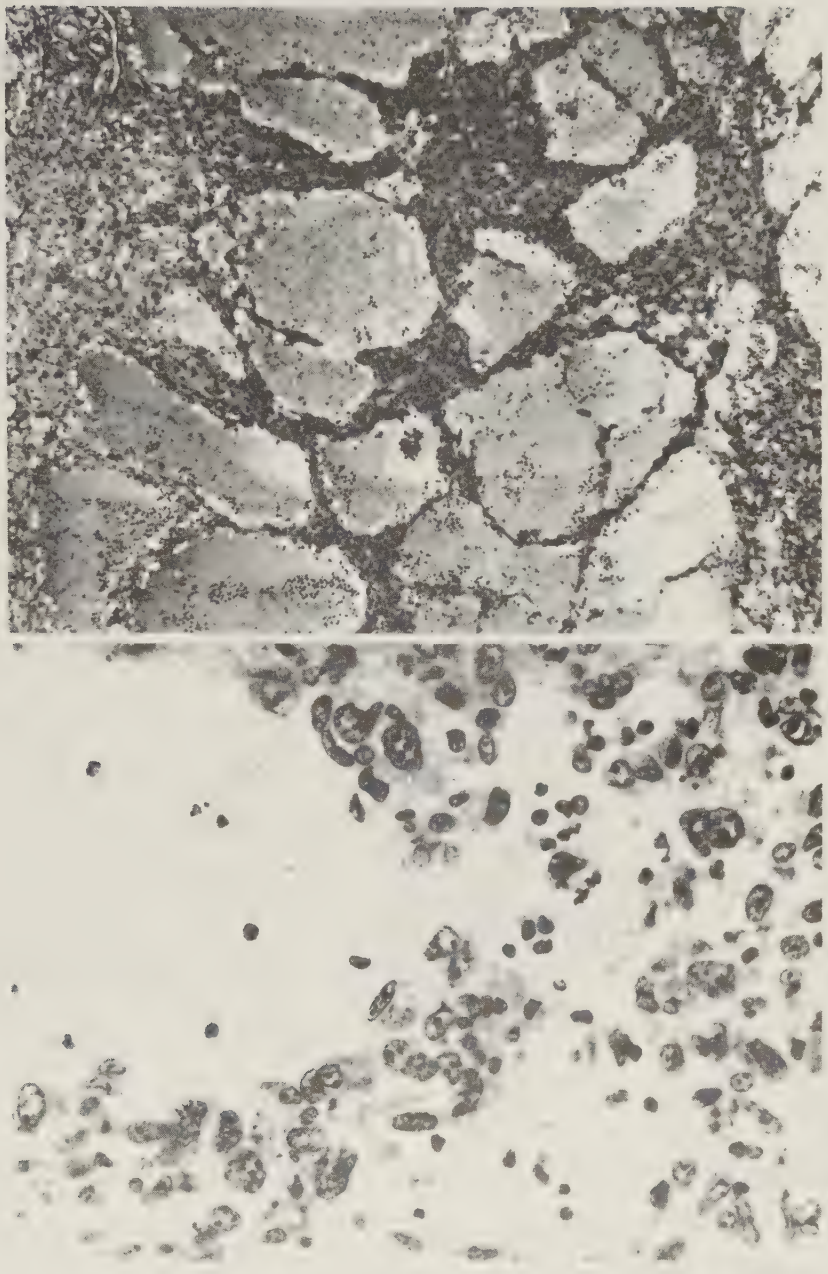


Fig. 5

A - Angio-endothéliome malin

B - Détail vu au fort grossissement avec monstruosités cellulaires.

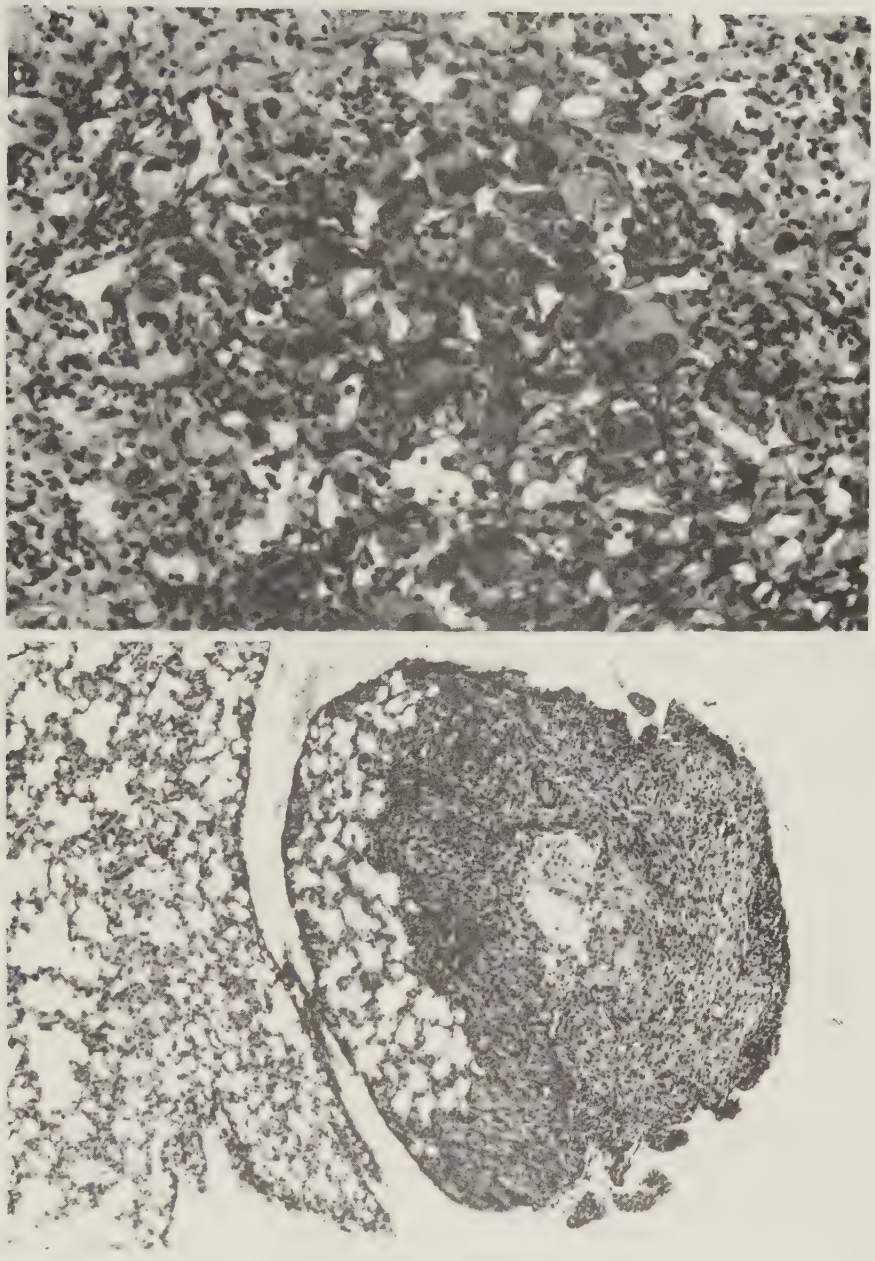


Fig. 6

A - Tumeur mésentérique (fort grossissement) à cellules géantes riches en cytoplasme dont les noyaux possèdent d'énormes nucléoles. Le tissu les entourant est riche en collagène.

B - Métastase pulmonaire d'aspect sarcomatoïde, reproduisant un des aspects de la tumeur.

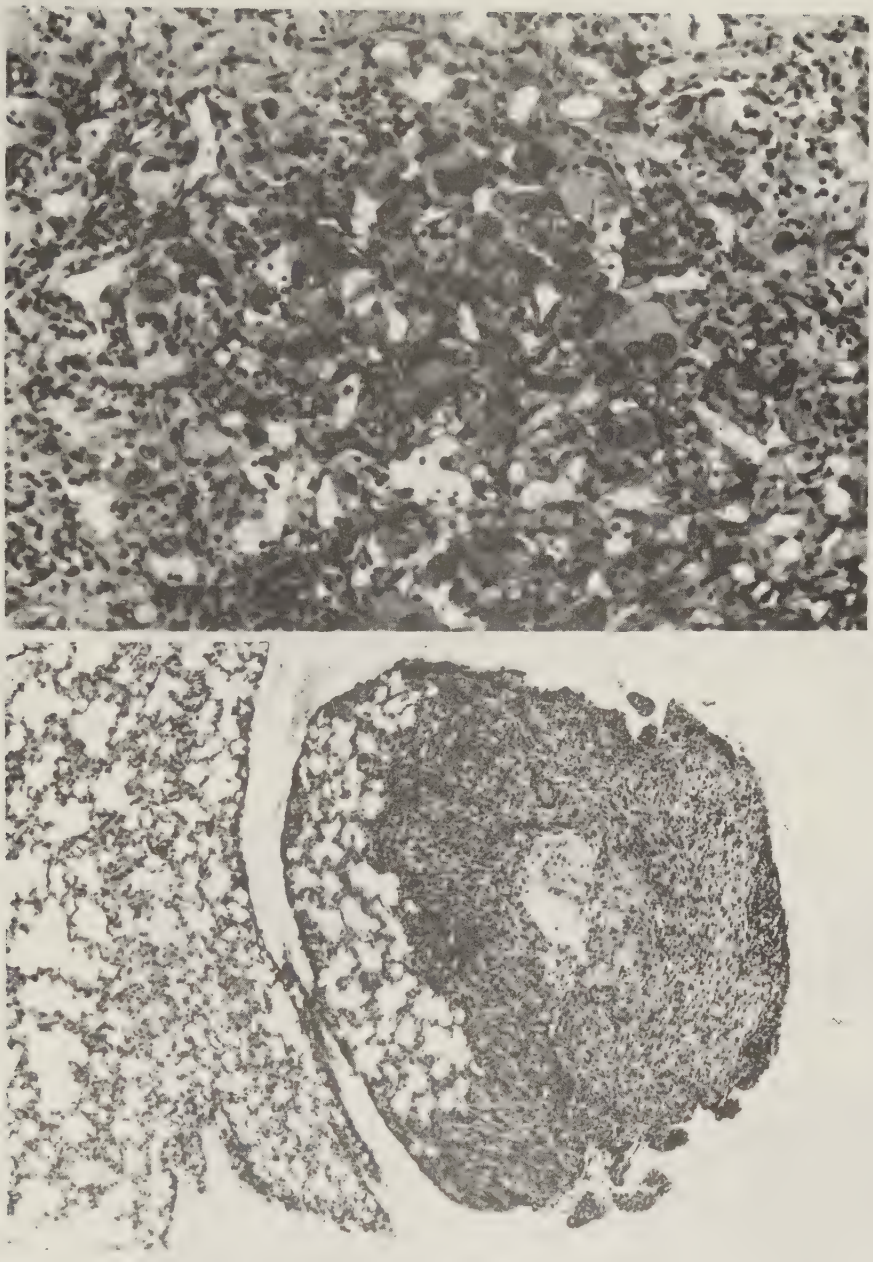


Fig. 6

A - Tumeur mésentérique (fort grossissement) à cellules géantes riches en cytoplasme dont les noyaux possèdent d'énormes nucléoles. Le tissu les entourant est riche en collagène.

B - Métastase pulmonaire d'aspect sarcomatoïde, reproduisant un des aspects de la tumeur.

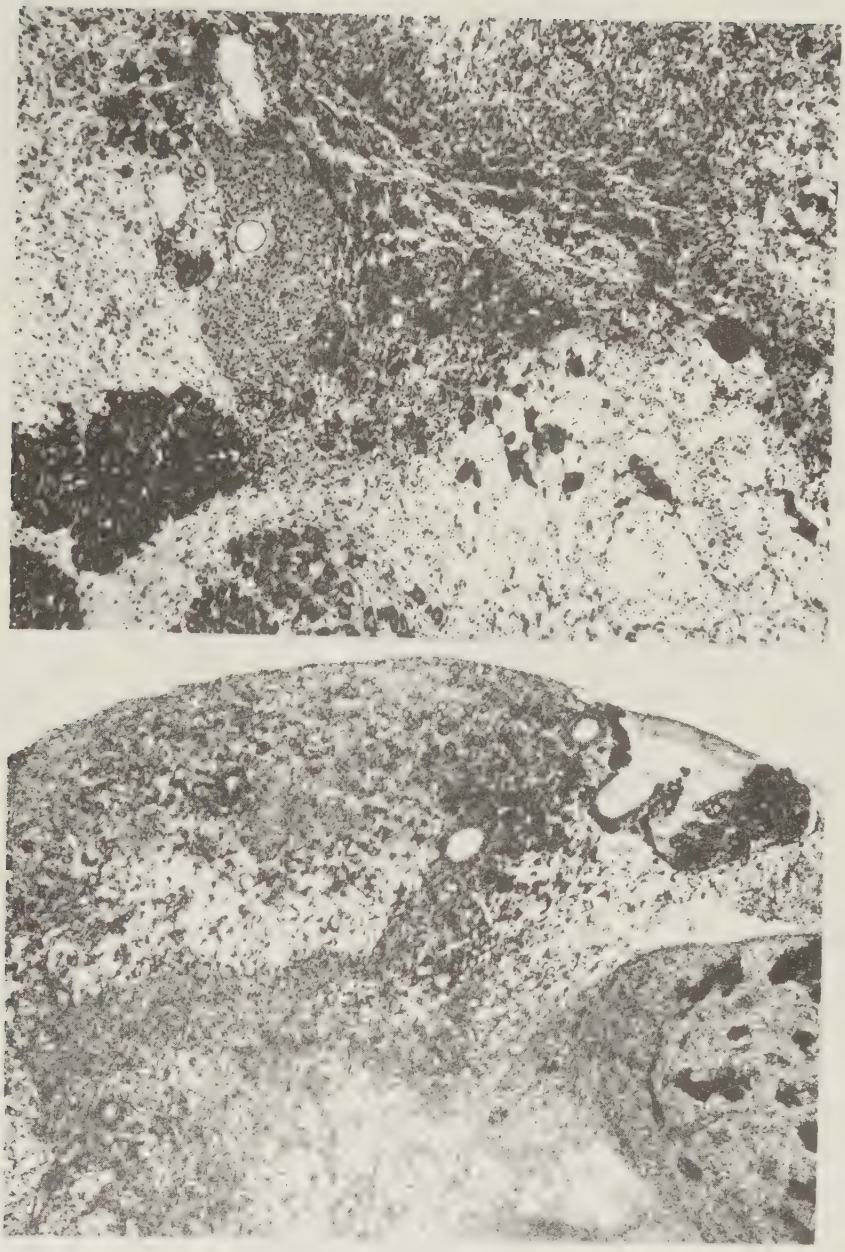


Fig. 7

A - Tumeur mésentérique (faible grossissement) dissociant le pancréas et avec un ilot de Langerhans hypertrophié.

B - Tumeur mésentérique (faible grossissement) avec ganglion envahi (en bas et à gauche).

DEUXIEME CHAPITRE

PENETRATION ET FIXATION DU DMBA AU NIVEAU DU TRACTUS DIGESTIF

Relativement peu d'études ont été entreprises concernant la distribution du DMBA consécutive à son administration par une voie quelconque. Les travaux de HADLER et LEE (1960), ceux de DOMSKY et Coll (1963) chez la souris sont cependant à relever, de même que ceux de FLESHER (1967) chez le rat. Les premiers ont montré que 30 secondes après une injection intraveineuse de DMBA radioactif, la radioactivité était retrouvée dans presque tout l'organisme : peau, sang, foie, rate, rein, etc ... Les derniers ont surtout retrouvé le tritium accumulé dans le tissu adipeux des rats. Un plus grand nombre d'études a été mené, concernant la distribution d'autres hydrocarbures. C'est le cas pour le benzopyrène (KOTIN et Coll 1959, DELWAIDE 1969), pour le méthylcholanthrène (FLESHER et SYDNOR 1960) et pour le dibenzanthracène (HEIDELBERGER et JONES 1948, HEIDELBERGER et WEISS 1951). Il ressort de l'ensemble de ces études que les hydrocarbures ont tendance à se répartir dans les tissus adipeux, peut-être pour des raisons de solubilité. GAMMAL et Coll (1965), BOCK et DAO (1961), JANSS et MOON (1970) ont par exemple retrouvé le DMBA après son ingestion dans le parenchyme mammaire de rats, riche en lipides. BOCK le décèle 24 heures après une instillation gastrique de 30 mg, GAMMAL 5 jours après l'administration.

Cette propriété n'est pas spécifique du DMBA, le 3-méthylcholanthrène (WIEDER et Coll 1967, DAO et Coll 1959) a été retrouvé plusieurs jours après son ingestion, le benzopyrène a été extrait de mitochondries de foie et de noyaux de foie de

.../...

souris, respectivement 5 jours et 21 semaines après son injection intrapéritonéale (CALCUTT et PAYNE 1953).

Pour interpréter les résultats précédents, des phénomènes quantitatifs et qualitatifs ont été évoqués. Le préestomac fixerait plus de DMBA que l'estomac glandulaire, d'où son action sur cette région, et l'administration lente de la substance permettrait, soit son accumulation au niveau du mésentère, soit une amélioration de son passage dans le système lymphatique par une sorte d'accoutumance. Il faut cependant tenir compte que les deux parties de l'estomac sont constituées de deux types cellulaires très différents l'un de l'autre, épithélial pour le préestomac, glandulaire pour l'autre partie. Il ne pouvait donc être exclu que la réponse sélective à l'hydrocarbure fut liée à une différence des propriétés morphologiques, biochimiques ou physiologiques des cellules. Enfin, lors de son transit dans l'intestin grêle, une transformation métabolique du DMBA en dérivés actifs sur les ganglions mésentériques devait également être envisagée. Toutefois, les deux types de phénomènes quantitatifs et qualitatifs ne s'excluaient pas. Pour cette raison ils ont été considérés dans leur ensemble, et des recherches sur la pénétration-fixation et le métabolisme du DMBA dans le tractus digestif et mésentère ont été entreprises. D'autre part, la fixation de l'hydrocarbure sur l'ADN, l'ARN et les protéines des deux parties de l'estomac et de l'intestin grêle a été étudiée.

.../...

I - MATERIEL ET METHODE

La fixation de l'hydrocarbure dans les principaux organes du tractus digestif a fait appel à deux techniques très différentes : la spectrophotométrie de scintillation et l'autohistoradiographie. La fixation sur l'ADN, l'ARN et les protéines a été étudiée en isolant ces molécules.

Dans tous les cas, sauf pour l'étude historadiographique, deux catégories de souris ont été utilisées: des souris normales et des souris dites accoutumées, stimulées ou prétraitées, ayant ingérées préalablement du 3-méthylcholanthrène, 40 heures auparavant, ou ayant reçu un régime contenant du DMBA pendant 4 mois. L'ingestion de 3-méthylcholanthrène est en effet très efficace pour réaliser une "stimulation" des enzymes microsomiales métabolisant les hydrocarbures en général et le DMBA en particulier, comme il sera précisé dans le chapitre III. Cette ingestion de méthylcholanthrène permettait ainsi de reproduire rapidement "l'accoutumance" nécessaire à nos expériences.

1°) - Technique de spectrophotométrie de scintillation

Le principe de la méthode est l'administration par voie orale ou intraveineuse de DMBA uniformément marqué au tritium puis de mesurer la radioactivité des différents organes du tractus digestif et du mésentère. Dans le but d'avoir une information plus complète, la radioactivité présente dans les reins a également été mesurée. Le DMBA tritié à raison de

.../...

8 300 mCi/mM provenait du Radiochemical Centre d'Amersham (Angleterre).

Administration par voie orale

Les souris IC (Institut du Cancer) normales et accoutumées ont été réparties dans des cages individuelles. Les souris accoutumées avaient reçu pendant 4 mois du DMBA non marqué incorporé dans leur régime (dose totale 1 mg environ). Les deux lots de souris, à jeûn de la veille, ont reçu 100 µCi de DMBA-^{3}H dissous dans de l'huile d'olive et incorporé dans une patée faite de farine de leur régime habituel. La patée, mise dans une boîte de Pétri, a été entièrement consommée. Il faut toutefois remarquer que le temps de la consommation n'est pas absolument identique pour toutes les souris. Celles-ci ont été ensuite réparties au hasard par lots de 3 et sacrifiées 6, 15, 18, 24, 30 et 48 heures après le début, considéré comme le temps zéro, de leur repas radioactif.

Une série de prélèvements a été réalisée 1, 2 et 4 heures après l'ingestion de l'hydrocarbure marqué, mais il semble que les variations dues aux temps individuels de consommation ne soient effacées qu'à six heures, l'estomac étant alors généralement vide. L'estomac a été prélevé intégralement et séparé en ses deux parties constitutives : préestomac et estomac glandulaire Pour les autres organes 150 mg ont été prélevés en prenant soin d'utiliser toujours la même fraction d'organe surtout en ce qui concerne l'intestin grêle (1ère partie). Pour éliminer

.../...

toute contamination possible par des débris alimentaires, les prélèvements ont été soigneusement lavés à l'eau courante et avec du sérum physiologique, puis hydrolysés par de la soude décinormale, à raison de 5 ml pour 100 mg de tissu, à 56°C pendant 36 heures.

Administration par voie intraveineuse

Une suspension de DMBA-^{3}H dans une solution colloïdale aqueuse de gélatine à 1 % à été préparée selon la méthode de DELLA PORTA et Coll (1958). Chaque souris a reçu dans la veine caudale une injection de 0,5 ml de suspension contenant du DMBA d'une radioactivité totale de 100 µCi.

Les prélèvements et la préparation des hydrolysats ont été effectués de la même façon que ci-dessus.

La radioactivité des hydrolysats a été mesurée dans un compteur à scintillation liquide (Packard tri Carb). Le liquide scintillant utilisé était constitué de 100 mg de diméthyl P.O.P.O.P* et de 4 g de P.P.O** pour un litre de toluène. Les comptages ont été effectués sur 0,1 ml d'échantillons dispersés dans 10 ml de liquide scintillant et 3 ml d'éthanol absolu.

2°) - Technique d'autohistoradiographie

Des souris IC (Institut du Cancer) femelles âgées de 3 mois ont été utilisées. Elles ont reçu, après 24 heures

---

* diméthyl P.O.P.O.P-1,4bis 2-(4-méthyl-5-phényloxazolyl)-benzène (scintillation grade)

** P.P.O. - 2,5-diphényloxazol (scintillation grade).

de jeûne, une instillation par tubage gastrique de 250 µCi de DMBA-^{3}H dissous dans 0,4 ml d'huile d'olive. Les souris ont été sacrifiées 4 heures après le tubage et les différents organes, préestomac, estomac glandulaire, intestin grêle, foie et mésentère ont été prélevés puis lavés par un coton inbibé d'acétone.

Des coupes en congélation, d'une épaisseur de 5 µ, ont été effectuées en utilisant des rates comme support, puis fixées par des vapeurs de formol neutre à 10 % pendant 3 heures 1/2. Après une heure de lavage avec de l'acide perchlorique à 5 %, puis 1 heure 1/2 de rinçage à l'eau courante, les lames ont été recouvertes d'une émulsion photographique (Ilford Nuclear Research type K_2) et laissées pendant un mois à l'obscurité à une température de + 4° C. Elles ont été révélées pendant 4 minutes, lavées, puis fixées durant 6 minutes.

Le révéléteur utilisé a été préparé selon la formule Kodak :

Rhodol	2,2 g
Sulfite de Sodium anhydre	72 g
Hydroquinone	8,8 g
Carbonate de soude anhydre	48 g
Bromure de Potassium	4 g
eau qsp	1 litre

Le fixateur type G 301 Kodak a été préparé à partir de :

Thiosulfate de Na ou K	200 g
Métabisulfite de Na ou K	25 g
eau qsp	1 litre

Révélation et fixation ont été effectuées dans un bain marie à 17-18°C.

Les lames ont enfin été colorées au vert de Méthylpyronine avant d'être examinées.

3°) - Extraction de l'ADN, l'ARN et des protéines de l'estomac et de l'intestin grêle.

Nous nous sommes servis de la méthode de BROOKES et Coll mise au point pour les cellules en culture. Des modifications ont cependant dues être apportées pour l'adapter à nos besoins. Les animaux employés, des souris de la lignée C négative, étaient âgées de 4 mois. Ont été utilisées : des souris normales mises ou non à jeûn 24 heures auparavant, et des souris prétraitées par 3 mg de 3-méthylcholanthrène 30 heures avant leur utilisation, ces dernières n'étant pas mises à jeûn. 24 heures avant leur sacrifice les souris ont reçu, par tubage gastrique, le DMBA-^{3}H ou le benz(a)anthracène tritié, dissous dans 0,2 ml d'huile d'arachide. Deux sortes de DMBA-^{3}H ont été administrés, l'un d'une activité spécifique de 500 mCi/mM et l'autre de 81,5 mCi/mM. L'activité spécifique du benz(a)anthracène était de 318 mCi/mM. Ces trois produits provenaient du Radiochemical Centre d'Amersham (Angleterre).

Extraction des acides nucléiques et des protéines.

40 animaux ont été utilisés pour les deux parties de l'estomac, et cinq pour l'intestin grêle. Ces prélèvements ont été faits aussi rapidement que possible sur de la glace

.../...

carbonique puis homogénéisés par un mixer (ultraturrax) dans le mélange suivant :

- 500 ml de 4-p-amino-salicilate
- 50 ml de phénol-m crésol-8-hydroxyquinoleine-eau (dans les rapports respectifs de : 500-70-0,5-55)
- 5 ml de Dodecyl-sulfate 10 %

Phénol et crésol étant fraichement redistillés.

Ce mélange était au préalable refroidi par de la glace. Une centrifugation de 10 à 15 minutes à 2 000 trs/mn (internationale) a permis de séparer deux phases, l'une aqueuse et l'autre phénolique. La phase aqueuse a été lavée par 25 ml du mélange phénol-crésol-8-hydroxyquinoleine-eau, et la phase phénolique par 50 ml de para-amino-salicilate.

Précipité de la phase phénolique par addition d'un volume (50 ml) de 2-éthoxyéthanol, puis isolé à l'aide d'une baguette de verre, l'ADN a été lavé par un volume d'éthanol absolu. L'ARN précipitait lentement de la phase phénolique lorsque celle-ci était abandonnée une vingtaine d'heures.

Les protéines ont été précipitées de la phase aqueuse par 300 ml de méthanol.

Purification des extraits.

L'ADN redissout dans 8 ml d'une solution saline d'acétate de sodium (2 %) et de chlorure de sodium (1,5 %) à été centrifugé 30 minutes à 100 000 g. L'addition de un volume de 2 éthoxyéthanol l'a ensuite précipité du surnageant. L'ARN a été

.../...

centrifugé puis lavé successivement par 5 ml d'éthanol 75 %, 5 ml d'éthanol absolu, puis 5 ml de diéthyl éther. Les protéines ont été lavées 3 fois par de grandes quantités (500 ml) de méthanol. Enfin ADN, ARN et protéines ont été rincés à l'éther puis deshydratés dans un dessicateur sous pression réduite.

Hydrolyse des extraits.

L'ADN (10 mg/ml) a été hydrolysé par la DNase en présence de sulfate de magnésium pendant 48 heures à 37°C. L'hydrolyse de l'ARN (10 mg/ml) a été faite par l'acide chlorhydrique pendant 4 heures à 100°C. Les protéines (10 mg) ont été dissoutes dans du tétraéthylammonium hydroxyde à 25 % (0,4 ml) pendant 48 heures.

Comptage de la radioactivité.

Les comptages ont été effectués pendant 20 minutes sur 0,5 mg de protéines et d'ADN et sur 2,5 mg d'ARN, par l'intermédiaire de 10 ml de liquide scintillant. Les résultats, compte ayant été tenu du Quenching et de l'efficacité du compteur, sont exprimés en mμM d'hydrocarbure.

Filtration sur gel de Sephadex.

Dans le but d'éliminer la radioactivité éventuellement adsorbée sur l'ADN et non fixée, celui-ci a été filtré sur une colonne de Sephadex (10 cm x 1 cm) G 25 fine. L'ADN a été dissous dans 1 ml de tampon citrate et élué de la colonne par ce même tampon. Les fractions (3 ml) ont été examinées pour leur

.../...

absorption à 260 mμ puis hydrolysées par la DNase avant que leur radioactivité soit déterminée comme décrit précédemment. Cette opération n'a été faite que pour deux cas : les préestomacs de souris traitées par 3 mg de DMBA-^{3}H et par 3 mg de BA-^{3}H.

II - RESULTATS et DISCUSSION

1°) - Pénétration-fixation du DMBA au niveau des différents organes du tractus digestif.

Les résultats (tableaux III et IV) sont exprimés en nombre de coups par minute et par gramme de tissu frais (cpm/g). Le "bruit de fond" dû à la technique (liquide scintillant, mouvement propre au compteur etc ...) ainsi que la radioactivité naturelle des organes ont été mesurés et soustraits de la radioactivité totale des échantillons.

Ces résultats montrent que la radioactivité des divers organes subit des fluctuations au cours des 24 heures qui suivent l'administration du DMBA-^{3}H. Des "pics" de radioactivité ont été enregistrés 15 heures et 24 heures après l'ingestion de l'hydrocarbure, exception faite pour le mésentère des souris normales et l'intestin grêle des souris accoutumées (fig. 8 et 9).

La radioactivité du préestomac après l'administration orale de DMBA-^{3}H est dix à vingt fois supérieure à celle des autres segments du tube digestif (fig. 8). Cette radioactivité, très élevée dès la première heure, décroit rapidement au début (de 1 à 6 heures) puis progressivement, en "dents de scie" ensuite (fig. 8). Les autres segments du tube digestif ont une radioactivité comparable entre eux, bien que celle de l'intestin

grêle des souris accoutumées soit plus élevée que celle des souris normales six heures après le traitement (fig. 9).

La radioactivité du mésentère des souris normales est relativement faible, du même ordre que celle de l'estomac glandulaire ou de l'intestin grêle des mêmes souris (fig. 9). Par contre chez les souris accoutumées, cette radioactivité est maximum entre 6 et 19 heures. Il est remarquable que cette augmentation suive immédiatement celle enregistrée dans l'intestin grêle des mêmes souris (fig. 9).

Dans le foie et les reins des fluctuations sont également enregistrées dans les 24 heures qui suivent l'ingestion de l'hydrocarbure. Il est probable que ces variations soient liées à l'absorption par les différents segments du tube digestif.

Après l'administration intraveineuse du DMBA-^{3}H, (fig. 10) il ressort que le préestomac ne fixe pas plus d'hydrocarbure que les autres parties du tube digestif. De plus, la radioactivité des deux parties de l'estomac, de l'intestin grêle et du mésentère ne diffère pas considérablement de celle observée dans les mêmes organes des souris normales traitées par voie orale. Le DMBA-^{3}H est surtout retrouvé dans le foie puis le rein, ce qui donne une indication sur les voies possibles d'élimination de l'hydrocarbure administré par voie intraveineuse.

L'étude autohistoradiographique, effectuée sur des organes prélevés 4 heures après l'ingestion du DMBA-^{3}H par les souris, confirme les résultats obtenus par comptage au

.../...

scintillateur. Elle met en valeur la fixation beaucoup plus importante qui a lieu au niveau du préestomac qu'au niveau de l'estomac glandulaire (fig. 11 et 12). La fixation dans le préestomac (fig. 11) est localisée essentiellement dans la couche kératinisée, l'épithélium et la partie proximale du chorion sous-jacent. Par contre dans l'estomac glandulaire (fig. 12) on ne distingue pratiquement pas de "grains" dû à la radioactivité. Au niveau de l'intestin grêle (fig. 13) une faible radioactivité est relevée uniquement dans le chorion, alors que dans le foie (fig. 14) le taux de radioactivité atteint est intermédiaire. L'aspect quantitatif du problème n'a pas été approfondi par cette méthode autoradiographique étant donné que la méthode faisant appel à la scintillation paraissait nettement plus appropriée. Nous remarquons enfin que ces autohistoradiographies, si elles nous renseignent sur la topographie tissulaire de la fixation du DMBA, ne nous renseignent pas sur celle intracellulaire. Cette dernière a été étudiée en ce qui concerne l'ADN, l'ARN et les protéines de l'estomac et de l'intestin grêle, par l'intermédiaire d'autres techniques, et est relatée dans les pages qui suivent.

Ces résultats appellent de nombreux commentaires mais une hypothèse doit être immédiatement levée, c'est celle de la validité de la technique employée. En effet c'est un produit marqué au tritium qui a été utilisé et les chapitres suivants montrent qu'il est partiellement métabolisé. Il n'est donc pas

.../...

impossible que nos mesures soient faussées par des ions hydrogènes libérés lors de ce métabolisme et réutilisés par l'organisme. Du tritium est effectivement libéré du cycle benzanthracénique (20 à 30 %) mais DANIEL et PRATT (1967) ont montré que ce tritium était éliminé très rapidement sous forme d'eau tritiée dans les urines. Dans le chapitre III il sera montré que l'élimination de cette eau a lieu probablement dans les quatre heures qui suivent l'ingestion de l'hydrocarbure. Donc, bien qu'on ne puisse écarter totalement le fait qu'une partie du tritium libéré soit réutilisée, on peut considéré que la radioactivité enregistrée dans les organes est une bonne image de la quantité de DMBA réellement présente dans les organes.

Les fluctuations de radioactivité enregistrées dans les 24 heures qui suivent l'ingestion de l'hydrocarbure sont probablement une conséquence de la physiologie de la digestion et des sécrétions internes du tube digestif qui l'accompagnent. Un parallèle peut être établi entre la pénétration-fixation du DMBA au niveau du préestomac et celle du 3,4 benzopyrène étudiée par fluorescence (SETALA et Coll 1950, ERMALA et Coll 1951). Toutefois, il mérite d'être noté que la pénétration du DMBA, et probablement celle des autres hydrocarbures polycycliques, dans le préestomac, est orientée de la lumière de l'organe vers l'intérieur. Ceci est confirmé par l'étude autohistoradiographique (fig. 11) qui met en évidence le marquage important des zones superficielles de l'organe alors que les zones profondes

.../...

sont de moins en moins marquées. Il est probable que la plus grande densité de la radioactivité des couches superficielles est essentiellement due à la précocité du prélèvement, mais aussi à l'entrainement de l'hydrocarbure par la circulation générale au fur et à mesure qu'il pénètre plus en profondeur. Cette hypothèse est également étayée par le fait que l'injection intraveineuse du DMBA n'entraine pas son accumulation dans le préestomac. De plus cette polarisation est bien en accord avec les propriétés physiologiques des cellules épidermoïdes. Il est remarquable enfin que le préestomac se comporte envers le DMBA comme la peau envers les autres hydrocarbures : une fixation précoce et élevée suivie d'une décroissance rapide dans les 24 heures suivant le traitement (BOCK 1964). Il semble donc que l'effet du DMBA sur le préestomac soit à rapporcher de celui exercé sur la peau et les autres organes de même type cellulaire.

Plusieurs phénomènes, bien illustrés par l'autohistoradiographie, (fig. 12) peuvent expliquer la non pénétration du DMBA dans l'estomac glandulaire. Le premier est la "barrière" constituée par le mucus qui recouvre cette zone et peut empêcher le contact de la substance avec la paroi de l'organe. Le rôle du solvant utilisé est alors primordial, EKWALL et Coll (1952) ayant montré que le 3,4 benzopyrène en solution huileuse ne pénétrait pas dans l'estomac glandulaire. Le second est en rapport avec les propriétés physiologiques de l'estomac glandulaire. En effet celles-ci sont des fonctions de sécrétion

.../...

vers la lumière de l'organe et non des fonctions d'absorption. On retrouve donc ici une polarisation en sens inverse de la précédente. Il est probable que les deux phénomènes interviennent conjointement et que la radioactivité enregistrée au niveau de l'estomac glandulaire est en grande partie due à l'apport du DMBA par voie sanguine, comme tend à le prouver l'injection intra-veineuse de la substance.

Il peut paraître curieux que dans l'intestin grêle le taux de radioactivité ne soit pas plus élevé, cet organe étant par excellence l'organe d'absorption du tube digestif. Il est probable que, du fait même de cette fonction, le transfert du DMBA doive se faire beaucoup plus rapidement sans possibilité d'accumulation. D'autre part, le DMBA arrive "dilué" dans l'intestin grêle et un phénomène de saturation ne doit pas se produire comme il doit se produire dans l'estomac. Ceci est cependant en contradiction avec les résultats obtenus par ERMALA et Coll en 1951 avec du 3,4 benzopyrène, d'autant plus que les histoautoradiographies d'intestin grêle conduisent à penser que, dans un premier temps, la substance, absorbée par le préestomac, est apportée par la voie sanguine ou lymphatique, la radioactivité de l'intestin grêle étant surtout localisée dans le chorion (fig. 13). On peut toutefois remarquer que 6 heures après l'ingestion de l'hydrocarbure la radioactivité de l'intestin grêle des souris "accoutumées" est supérieure à celle de l'intestin grêle des souris normales. La pénétration du DMBA paraît donc facilitée,

.../...

activée, chez les souris stimulées. Cette activation se traduit par une augmentation de la radioactivité du mésentère chez ces souris. Ce fait confirme donc l'hypothèse selon laquelle l'administration à long terme du DMBA provoquerait soit une facilitation d'absorption de l'hydrocarbure, soit une adaptation des systèmes enzymatiques le métabolisant en dérivés actifs sur le mésentère. Ces résultats donnent seulement une appréciation quantitative sans renseigner sur l'aspect qualitatif du problème. L'étude du métabolisme du DMBA rapportée dans le chapitre III éclairera, du moins nous l'espérons, cette question.

2°) - Fixation du DMBA au niveau des constituants biochimiques.

L'étude systématique du rendement d'extraction n'a pas été effectuée, mais la validité de la méthode utilisée a été discutée abondamment par BROOKES et LAWLEY (1964). HENNING et Coll (1969) ont séparé par chromatographie comme décrit par MONIER et Coll (1962), l'ARN ribosomal de l'ARN de transfert, isolés par cette technique au phénol. Il est probable, bien que cette technique soit totale, qu'une partie de l'ARN messager reste dans la phase aqueuse. D'autre part COLBURN et Coll (1968) évaluent la contamination de l'ADN par moins de 3 % de protéines, estimées par la méthode de KEELER, (1959) et moins de 2 % d'ARN.

Il est a remarquer (tableau V) que le fait de mettre les animaux à jeûn ne modifie pas de façon importante la radioactivité fixée, de même que l'activation de leur métabolisme par une ingestion préalable de 3-méthylcholanthrène. Quand la

.../...

dose de DMBA administrée est faible, de l'ordre de quelques µg, (5 ou 10), la différence de radioactivité des deux parties de l'estomac n'est pas significative. La plus grande part de la substance paraît absorbée au niveau de l'estomac et n'atteint quasiment pas l'intestin grêle. Au niveau de l'estomac, le fait le plus remarquable est la fixation beaucoup plus importante qui a lieu sur l'ADN et les protéines du préestomac que sur ceux de l'estomac glandulaire.

S'agit-il d'un phénomène lié à la pénétration de l'hydrocarbure, puisqu'il a été montré que celle-ci est 10 à 20 fois plus grande dans l'un que dans l'autre ? Il ne semble pas qu'il en soit ainsi, puisque paradoxalement l'ARN de l'estomac glandulaire fixe autant de radioactivité que le préestomac, sinon plus.

Le benz(a)anthracène, étudié à titre de contrôle, est fixé de façon beaucoup plus importante que le DMBA. L'ARN et les protéines du préestomac sont en particulier plus radioactifs que ceux de l'estomac glandulaire. Il y a donc là un phénomène intéressant, d'autant plus que le benz(a)anthracène ne provoque pas de transformations cellulaires de l'estomac.

Au niveau de l'intestin grêle la fixation de DMBA sur l'ADN et les protéines est comparable à celle du préestomac. Par contre l'ARN de l'intestin grêle fixe une quantité plus grande de radioactivité que l'ARN de l'estomac. La fixation du benzo(a)anthracène est sensiblement identique pour l'intestin et le préestomac, excepté pour l'ADN.

.../...

L'ADN du préestomac d'animaux intubés avec 3 mg de DMBA-^{3}H et 3 mg de BA-^{3}H, a été chromatographié sur gel de Sephadex avec un tampon citrate comme agent éluant. Le maximum de radioactivité a été retrouvé dans la fraction ayant l'absorption maximum à 260 nm. Il semble donc qu'il ne s'agisse pas d'une simple adsorption de l'hydrocarbure sur les composants étudiés.

RESUME DES DEUX PREMIERS CHAPITRES

Dans ces deux premiers chapitres les effets biologiques du DMBA administré par voie orale et sa fixation dans les principaux organes du tractus digestif ont été étudiés.

Il est apparu que le DMBA provoquait la formation de papillomes au niveau du préestomac et de tumeurs mésentériques, ces dernières impliquant une ingestion à faible dose et à long terme de l'hydrocarbure. L'étude de la fixation du DMBA a révélé que le préestomac en fixait 10 à 20 fois plus que l'estomac glandulaire, et que cette fixation était orientée du fait même de la physiologie de ces organes. Il a d'autre part été noté une facilitation de l'absorption de la substance par l'intestin grêle de souris "accoutumées" à l'hydrocarbure, facilitation se traduisant par une élévation passagère de la quantité de DMBA dans le mésentère. Il a également été montré que la pénétration du DMBA était suivie de sa fixation réelle sur l'ADN, l'ARN et les protéines des deux parties de l'estomac et de l'intestin grêle.

.../...

Ces résultats sont en accord étroit avec les effets biologiques du DMBA, en particulier les transformations cellulaires observées dans le préestomac et le mésentère.

TABLEAU III - RADIOACTIVITE (cpm x 10^{-4}/g de tissu frais) DE DIVERS ORGANES APRES ADMINISTRATION ORALE DU DMBA-^{3}H.

SOURIS	ORGANES	MOMENT DU PRELEVEMENT APRES LE TRAITEMENT (EN HEURES)								
		1	2	4	6	15	19	24	30	48
NORMALES	PREESTOMAC	481,89	412,94	392,55	240,10	216,63	71,06	169,43	29,07	55,01
	ESTOMAC GLANDULAIRE	24,16	19,48	19,25	16,47	26,12	8,08	21,30	6,42	2,98
	INTESTIN GRELE	41,41	46,58	26,47	20,62	27,01	9,64	23,15	8,94	4,46
	MESENTERE	-	-	-	16,27	13,89	17,86	11,12	6,80	5,30
	FOIE	-	-	-	35,25	51,12	33,98	41,91	24,87	10,35
	REIN	-	-	-	14,18	20,22	12,62	18,98	10,33	5,51
PRETRAITEES AU DMBA	PREESTOMAC	-	-	-	204,98	188,78	207,30	155,30	60,02	37,61
	ESTOMAC GLANDULAIRE	-	-	-	21,38	22,27	15,56	34,17	5,19	7,67
	INTESTIN GRELE	-	-	-	77,67	9,63	35,40	24,54	12,05	8,94
	MESENTERE	-	-	-	29,98	56,16	8,54	11,71	6,47	6,76
	FOIE	-	-	-	40,05	44,03	37,39	35,29	24,18	25,29
	REIN	-	-	-	22,36	19,79	16,98	14,98	10,70	11,33

TABLEAU IV - RADIOACTIVITE (en cpm x 10^{-4}/g de tissu frais) DES DIVERS ORGANES APRES ADMINISTRATION INTRAVEINEUSE DU DMBA-^{3}H.

	MOMENT DU PRELEVEMENT APRES LE TRAITEMENT (EN HEURES)				
ORGANES	6	15	19	24	48
PREESTOMAC	27,63	45,81	31,57	41,85	21,16
ESTOMAC GLANDULAIRE	38,12	34,52	29,14	36,88	21,37
INTESTIN GRELE	40,64	35,03	34,20	25,15	19,48
MESENTERE	26,26	35,12	39,42	26,36	26,17

TALBEAU V - mμM DE DMBA FIXES APRES ADMINISTRATION ORALE DANS DES CONDITIONS VARIEES DE 7,12-DIMETHYLBENZ(a)ANTHRACENE TRITIE (DMBA-^{3}H) ET DE BENZ(a)ANTHRACENE TRITIE (BA-^{3}H), PAR L'ADN, L'ARN et LES PROTEINES, DU PREESTOMAC (P) DE L'ESTOMAC GLANDULAIRE (G) ET DE L'INTESTIN GRELE (IG) DE SOURIS NORMALES ET STIMULEES PAR LE 3-METHYLCHOLANTHRENE (MC).

Nbre imaux	TRAITEMENTS	TISSUS	ADN mμM/g	ARN mμM/g	PROTEINES mμM/g
x 2	1 mg DMBA-^{3}H	P	6,1 - 7,6	- 5	59,2 - 88,8
		G	2,7 - 5,9	14,1 - 15,6	25,4 - 56
		IG	4,9 - 3,6	38,1 - 41,4	86,9 - 72
x 2	1 mg DMBA-^{3}H stimulées MC.	P	5,2 - 5,8	- 7	55,6 - 47
		G	1,9 - 2	7,6 -	17,2 - 10,6
		IG	9,6 - 3,9	25,2 - 61,3	47 - 53,6
x 2	3 mg DMBA-^{3}H à jeûn	P	24,6 - 34,7	19,8 -	179,2 - 207,5
		G	7,2 - 11,9	11,9 - 27,1	27,3 - 52,2
		IG	47,1 - 9,1	78,6 - 52,2	77,7 - 118,4
	3 mg BA-^{3}H à jeûn	P	22,9	441,3	557,00
		G	8,6	71,3	98,9
		IG	93,8	752,1	604,6
	1 ml DMBA-^{3}H à jeûn	P	4,6	5,5	38,6
		G	1,9	5,00	10,00
		IG	6,00	63,7	63,5
	10 μg DMBA-^{3}H	P	0,2	0,3	0,4
		G	0,2	0,3	0,4
	10 μg DMBA-3H	IG	2 x BF	2 x BF	0,2
	5 μg DMBA-3H	IG	2 x BF*	2 x BF	0,2

* Bruit de fond.

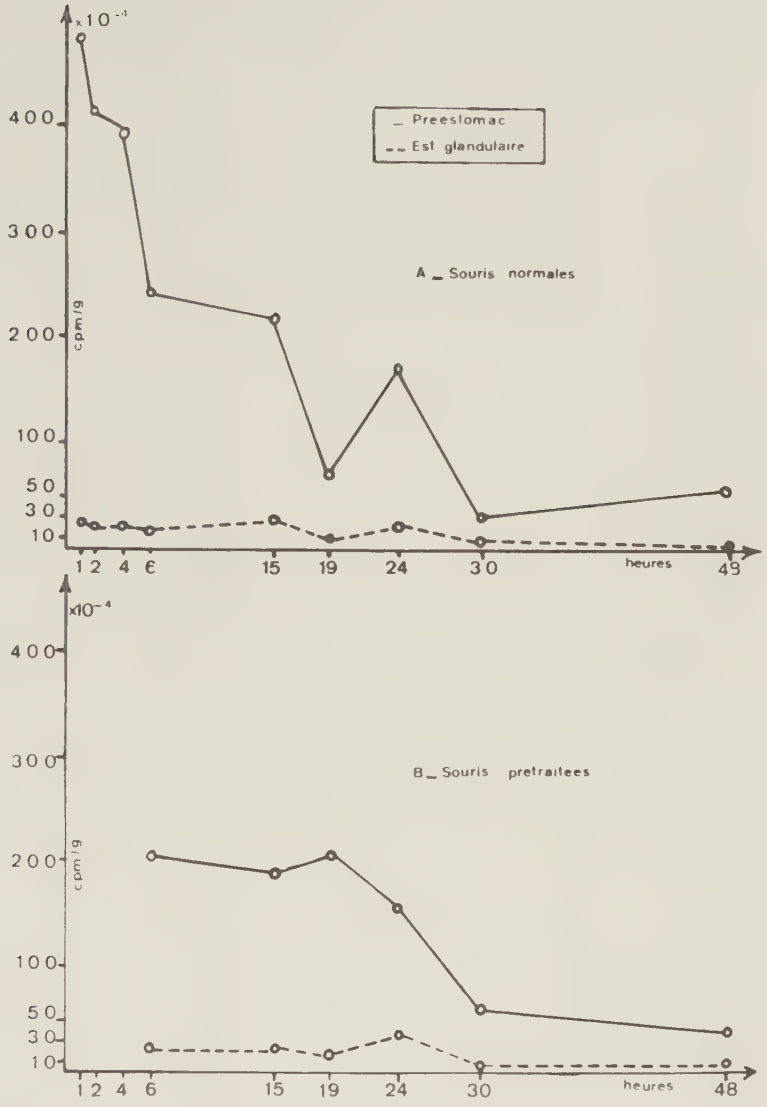


Fig. 8

Radioactivité du préestomac et de l'estomac glandulaire de souris normales ou prétraitées par le DMBA, après administration orale de DMBA-^{3}H

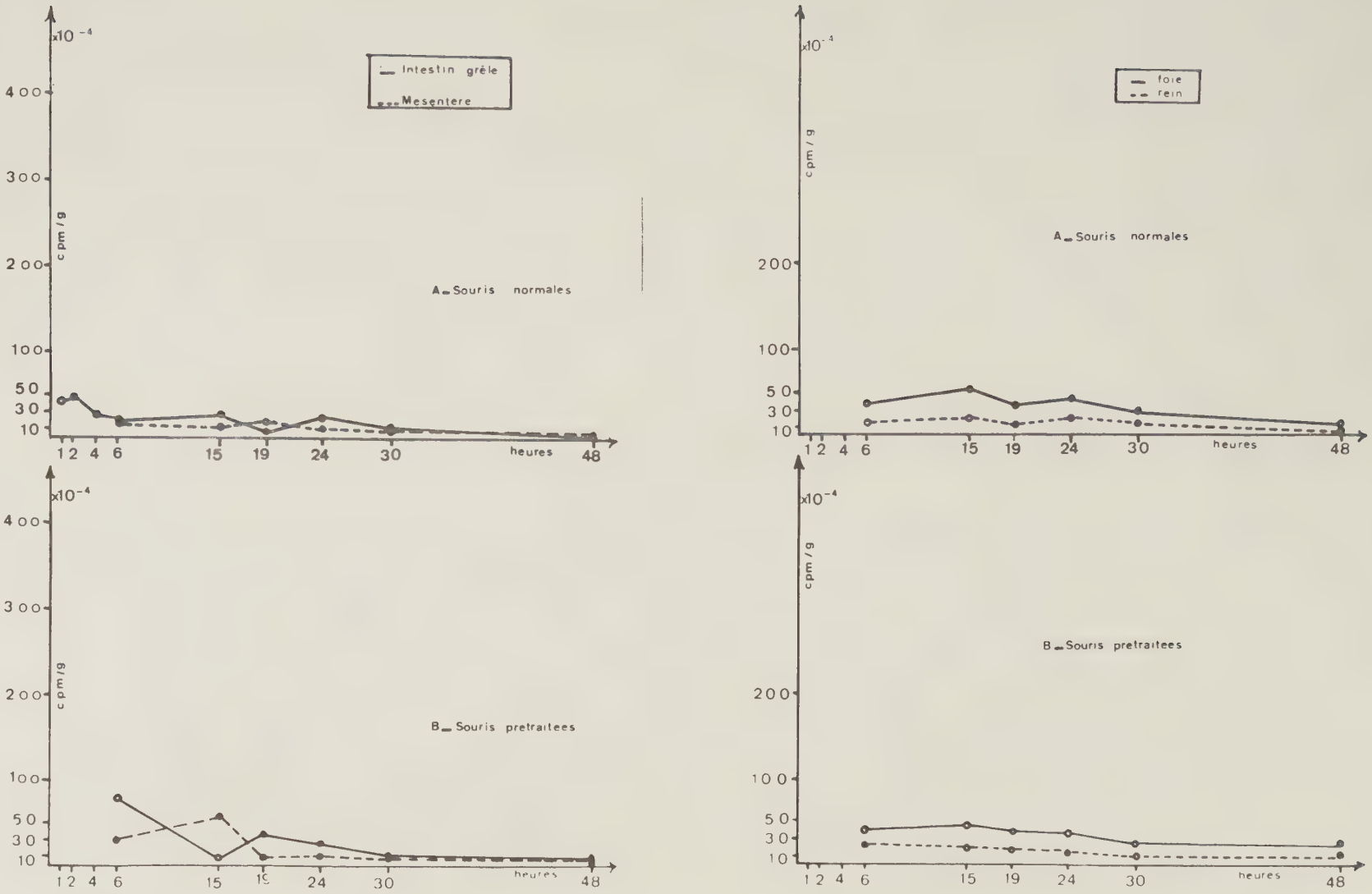


Fig. 9

Radioactivité de l'intestin grêle, du mésentère, du foie et du rein, de souris normales ou prétraitées par le DMBA, après administration orale de DMBA-^{3}H.

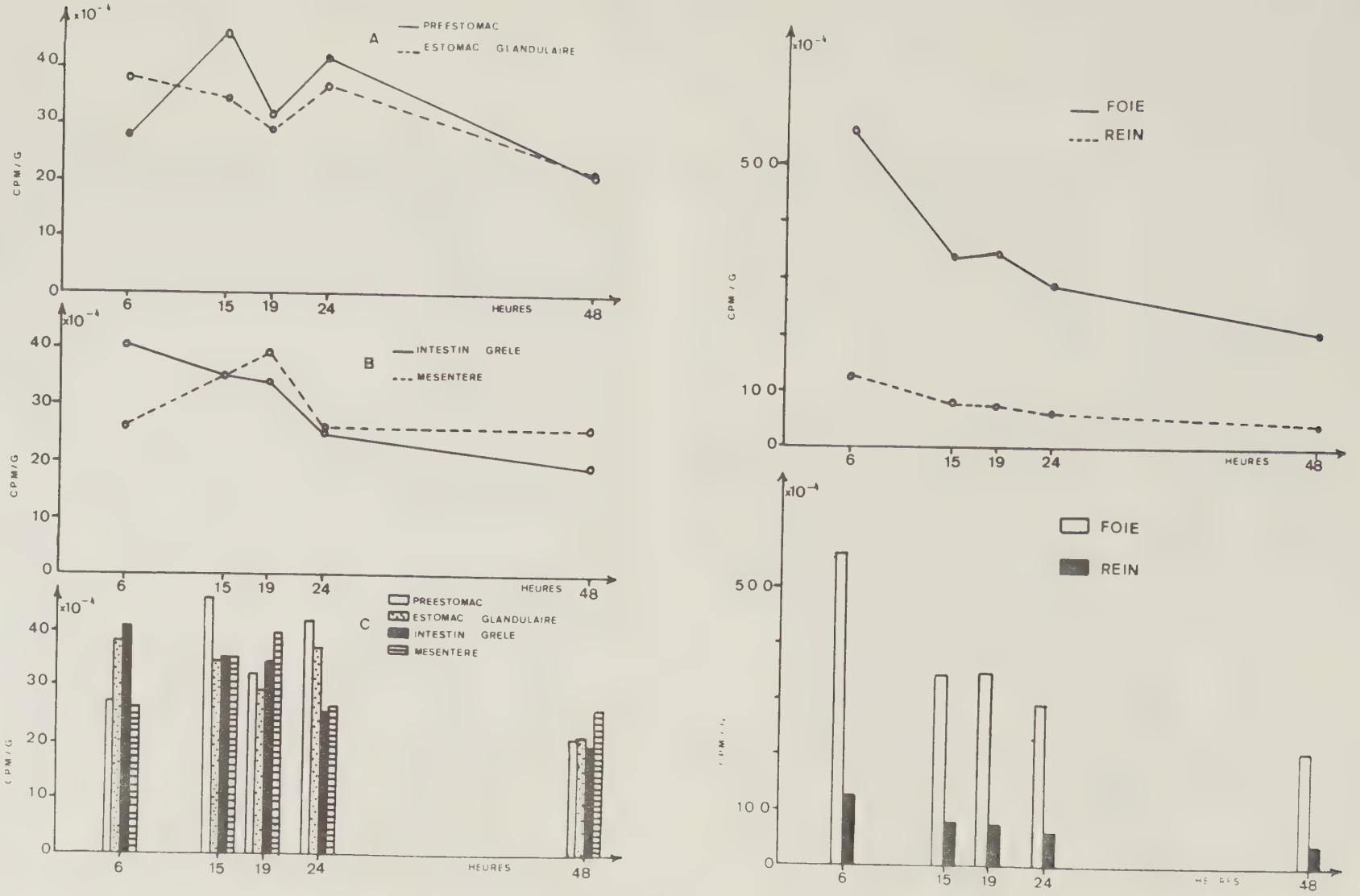


Fig. 10

Radioactivité du préestomac, de l'estomac glandulaire, de l'intestin grêle, du mésentère, du foie et du rein, de souris normales ou prétraitées par le DMBA, après administration intraveineuse de DMBA-^{3}H.

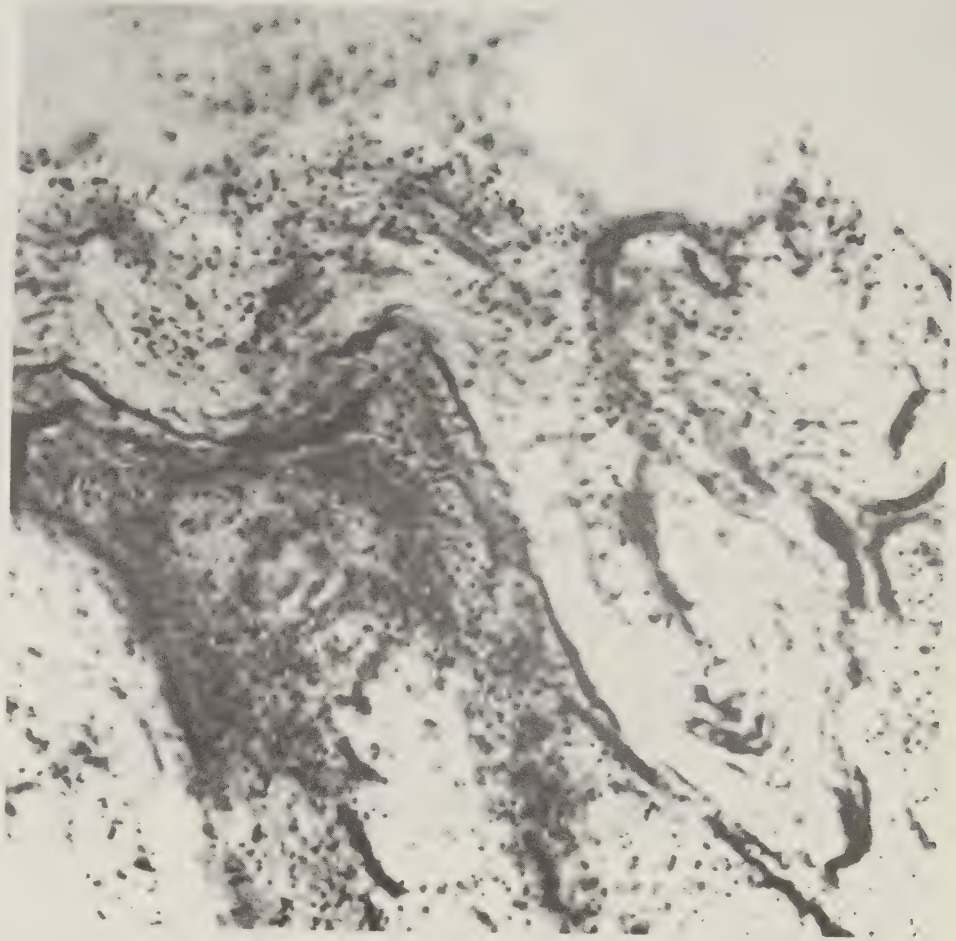


Fig. 11

A - Autohistoradiographie du préestomac (faible grossissement) les grains sont essentiellement localisés dans la couche kératinisée et l'épithélium.

B - Autohistoradiographie du préestomac détail au fort grossissement.

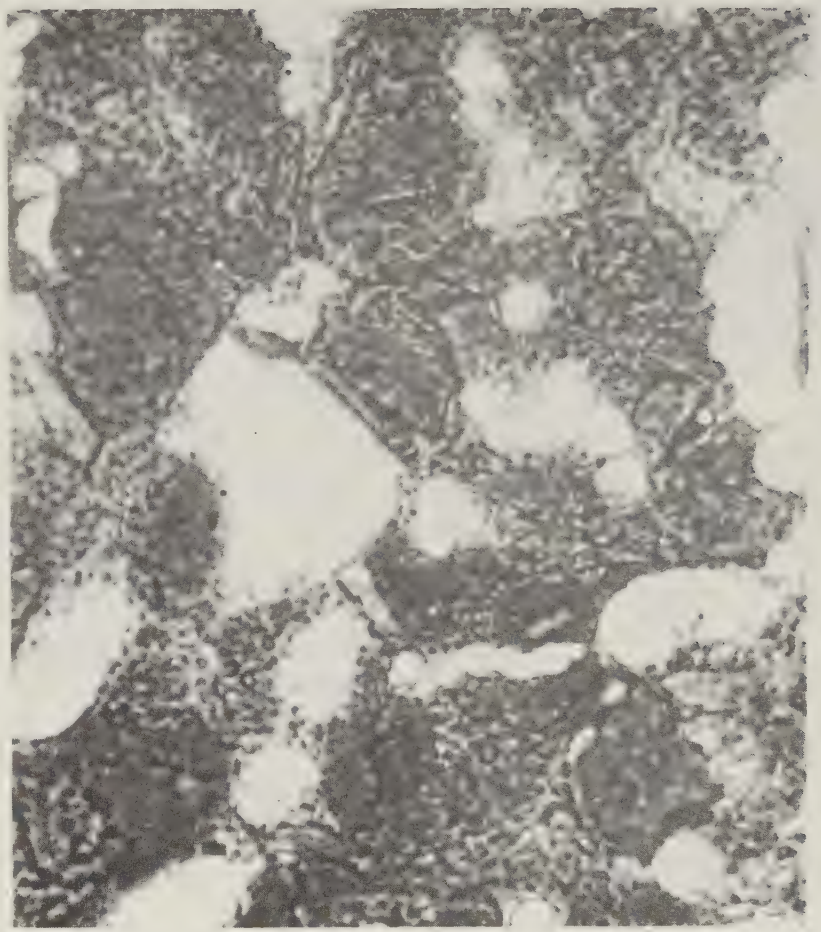


Fig. 12

A - Autohistoradiographie de l'estomac glandulaire - Faible grossissement On ne distingue pas de "grains radioactifs".

B - Autohistoradiographie de l'estomac glandulaire. Détail au fort grossissement.

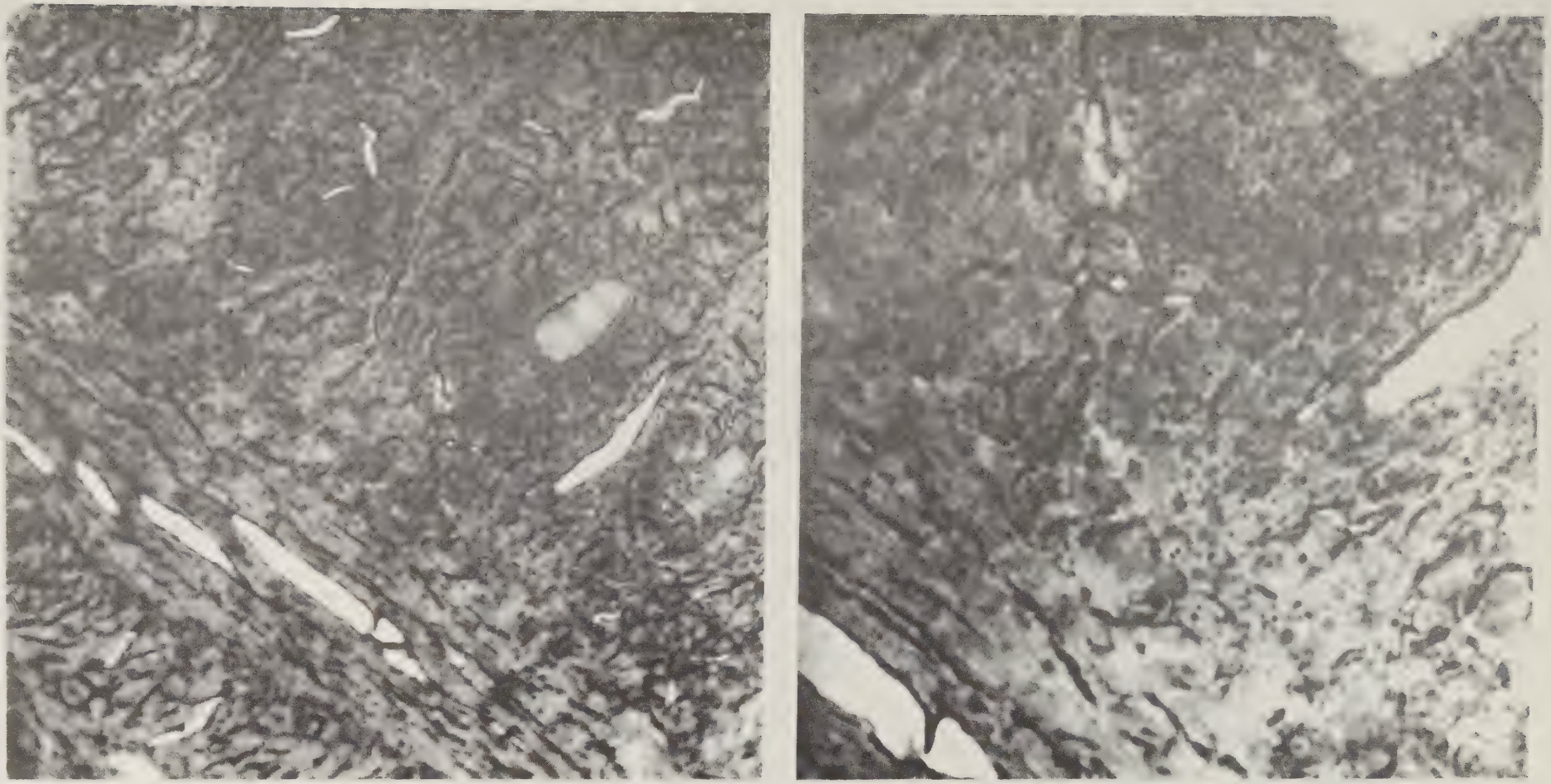


Fig. 13

A - Autohistoradiographie de l'intestin grêle (faible grossissement). On ne distingue pas de grains de radioactivité

B - Autohistoradiographie de l'intestin grêle. Détail au fort grossissement Quelques grains sont observés dans le chorion.

Fig. 14

Autohistoradiographie du foie (fort grossissement) montrant une radioactivité modérée.

TROISIEME CHAPITRE

METABOLISME DU DMBA AU NIVEAU DU TRACTUS DIGESTIF

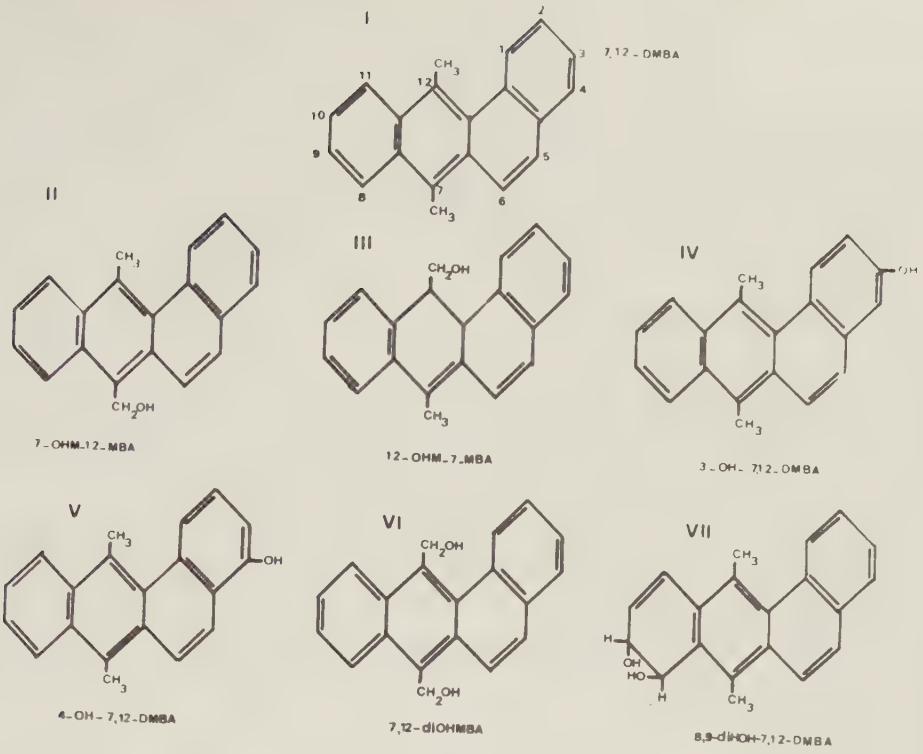


Fig. 15

PRINCIPAUX METABOLITES DECRITS DANS LE TEXTE
ET ABREVIATIONS UTILISEES.

I - 7,12-DMBA : 7,12-diméthylbenz(a)anthracène

II - 7-OHM-12-MBA: 7-hydroxyméthyl-12-méthylbenz(a) anthracène

III - 12-OHM-7-MBA: 12-hydroxyméthyl-7-méthylbenz(a) anthracène

IV - 3-OH-7,12-DMBA : 3-hydroxy-7,12-diméthylbenz(a) anthracène

V - 4-OH-7,12-DMBA : 4-hydroxy-7,12-diméthylbenz(a) anthracène

VI - 7,12-diOHM-BA : 7,12-dihydroxyméthylbenz(a) anthracène

VII - 8,9-diHOH-7,12-DMBA : 8,9-dihydro-8,9-dihydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène

Nous venons de décrire l'action du DMBA administré par voie orale à dose massive ainsi qu'à faible dose et à long terme. Il a été établi une corrélation entre la pénétration et la fixation de l'hydrocarbure d'une part, et la localisation des tumeurs induites, d'autre part. Si l'action directe du DMBA peut être incriminée dans la formation des tumeurs du préestomac, il n'en est pas de même pour les tumeurs mésentériques. Il a bien été constaté qu'une pénétration importante de DMBA-^{3}H avait lieu au niveau du mésentère chez les souris "accoutumées", mais ce fait n'élimine pas la possibilité de l'intervention de métabolites, son injection directe dans le péritoine n'induisant pas de tumeurs mésentériques.

Les études relatives au métabolisme du DMBA sont relativement récentes. Depuis quelques années cependant le nombre de publications sur ce sujet a considérablement augmenté.

C'est DICKENS en 1945, qui, le premier, a montré que le DMBA était métabolisé en isolant le 4-hydroxy-7,12-diméthylbenz(a) anthracène de l'urine de rat, mais le pas en avant le plus important a été réalisé par BOYLAND et SIMS en 1965. Ces derniers ont montré que des homogénats de foie de rat étaient capables de métaboliser in vitro le DMBA, principalement en dérivés monohydroxyméthylés (voir figure 15) : le 7-hydroxyméthyl-12-méthylbenz(a)anthracène (II) et le 12-hydroxyméthyl-7-méthyl-benz(a)anthracène (III). De petites quantités de composés dihydrodihydroxy et de composés phénolés ont également été

.../...

isolés. Ces résultats ont été confirmés depuis par JELLINCK et GOUDY en 1966 et SIMS (1970 a) puis par LEVIN et CONNEY en 1967.

Aucun métabolite portant sur la région K du DMBA n'a été trouvé; ce sont surtout les régions L et M qui sont modifiées. BOYLAND 1948-1949 pour expliquer ceci émit l'hypothèse que cette partie de la molécule pourrait être engagée dans une réaction avec un constituant cellulaire.

Au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle aucune étude à notre connaissance a été faite. Cependant WATTENBERG et Coll (1962) ont révélé une activité hydroxylasique de ces segments du tube digestif vis-à-vis du 3,4 benzopyrène. Ce benzopyrène serait hydroxylé en 8-hydroxy-3,4-benzopyrène puis en dérivés quinoniques.

Enfin, il faut signaler que des cultures de fibroblastes de souris (DUNCAN et Coll 1969, SIMS 1970) et de hamster (ALFRED et Coll 1969) métabolisent "in vitro" le DMBA.

De nombreuses drogues se sont montrées efficaces pour accélérer le métabolisme des substances cancérigènes, tels le 3,4 benzopyrène et le DMBA, et d'une façon plus générale des substances étrangères à l'organisme (CONNEY et Coll 1956 a, 1959, DAO et VARELLE 1966, GELBOIN 1967, NERBERT et GELBOIN 1969, SIMS 1970 b, c).

Cette stimulation, dont la nature n'est pas encore bien éclaircie, entraine une augmentation considérable de la

.../...

production des métabolites. Il s'agit probablement d'une synthèse d'enzymes microsomiales accrue par le traitement puisque les inhibiteurs protéiques inhibent ses effets (ARCOS et Coll 1961, GELBOIN et BLACKBURN 1963, 1964, DAO et YOGO 1964, BOYLAND et SIMS 1967, FURNER et Coll 1969). BOYLAND et SIMS 1967 ont principalement mis en évidence la production accrue d'un métabolite : le 8,9-dihydro-8,9-dihydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène (VII). Deux métabolites fluorescents A et B, de nature inconnue ont également été décrit par CONNEY et LEVIN (1966). Leur production est considérablement plus importante si les animaux sont "stimulés" par une injection d'autres hydrocarbures dont le plus efficace est le 3-méthylcholanthrène. Il a été dit précédemment que le DMBA devait être métabolisé pour être actif sur les glandes surrénales du rat et provoquer leur nécrose. De nombreux auteurs (DAO et TANAKA 1963 a, b, HUGGINS et PATAKA 1965, WHEATLEY et SIMS 1969) ont mis en évidence que la stimulation du métabolisme de l'hydrocarbure inhibait cet effet de même que l'hépatectomie partielle. Il semble donc bien que ce soit un métabolite intermédiaire qui soit actif. Ce métabolite n'est pas formé si le DMBA n'est pas métabolisé, et est ultérieurement dégradé quand le métabolisme des animaux est stimulé.

Cette augmentation des enzymes microsomiales n'est pas un privilège du foie, certains auteurs ont montré qu'on la rencontre dans différents tissus : l'intestin grêle (WATTENBERG et Coll 1962), les poumons et les reins, (WATTENBERG et Coll 1968). Le DMBA responsable de la nécrose et de l'apoplexie des glandes

.../...

surrénales chez le rat a sa nocivité vis-à-vis de ces organes considérablement atténuée ou abolie par une stimulation préalable. Cette protection paraît liée à la diminution de la quantité de 7-hydroxyméthyl-12-méthylbenz(a)anthracène produite métaboliquement après l'administration du DMBA (HUGGINS et Coll 1963, JELLINCK et GOUDY 1966) ou à une modification de sa dégradation ultérieure (SIMS, communication personnelle). Il a été d'autre part constaté que cette augmentation de la capacité de métaboliser les produits étrangers se retrouve dans les cellules en culture in vitro (ALFRED et GELBOIN 1967).

Plusieurs auteurs ayant montré cette possibilité de stimuler les enzymes microsomiales de la "benzopyrène hydroxylase" de l'intestin grêle, il nous a paru important de voir si cette stimulation pouvait intervenir également sur le métabolisme du DMBA au niveau du tube digestif, puisque les tumeurs mésentériques que nous avons obtenues impliquent une adaptation qui s'exprime probablement par une stimulation enzymatique.

CONNEY et LEVIN (1966) ayant décrit pour leur part la production de deux métabolites A et B fluorescents de nature inconnue, il était important de voir s'ils étaient produits par l'intestin grêle, dans quelles conditions et, de plus, d'essayer d'en déterminer la nature.

Nous avons également, à titre de contrôle et dans l'espoir de déterminer si ce sont les mêmes enzymes qui sont impliquées dans le métabolisme du DMBA et celui du benzopyrène,

.../...

mesurer systématiquement la "benzopyrène hydroxylase", c'est-à-dire la quantité de 3-OH-BP formée par les incubations d'intestin grêle quand le substrat en est le benzopyrène.

Deux études "in vitro" ont alors été entreprises parallèlement :

Etude A : Métabolisme du DMBA tritié par des homogénats de foie, de préestomac et d'intestin grêle.

Etude B : Influence de la stimulation sur le métabolisme de DMBA tritié, sur la production des métabolites A et B de CONNEY et LEVIN, et sur la "benzopyrène hydroxylase". Dans cette étude l'influence du temps d'incubation a également été testée.

Une troisième étude a enfin été menée "in vivo" concernant les voies et les formes d'élimination du DMBA ainsi que la distribution de ses principaux métabolites dans le tube digestif.

I - METABOLISME DU DMBA "IN VITRO".

Le métabolisme du DMBA a été étudié in vitro en utilisant des préparations d'homogénats de foie, des deux parties de l'estomac et de l'intestin grêle. Les métabolites isolés ont été identifiés par leur propriétés migratrices en chromatographie sur couche mince et leur propriétés spectrales d'absorption dans l'ultraviolet, en comparaison avec des corps dérivés du DMBA synthétisés chimiquement et pouvant être des métabolites possibles

.../...

Nous verrons donc tout d'abord la synthèse de ces substances puis le métabolisme in vitro par des homogénats des principaux organes du tractus digestif. Nous verrons également l'effet de la stimulation du métabolisme de ces homogénats par le méthylcholanthrène.

A - MATERIEL ET METHODES

1°) - Synthèse des dérivés de référence.

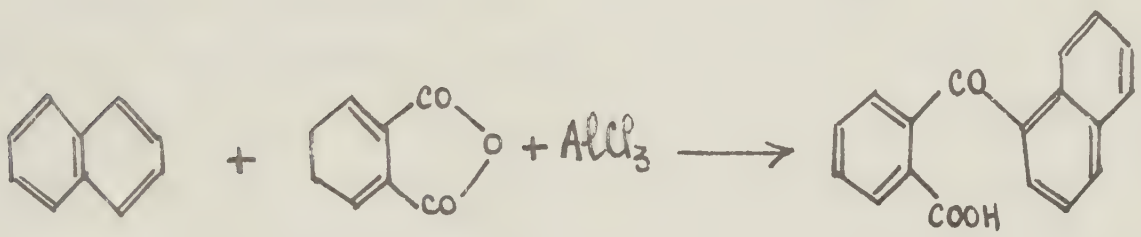
Les principaux corps qui ont été synthétisés sont la benzanthracène 7,12 quinone, le DMBA lui-même, le 7-hydroxyméthyl-12-méthylbenz(a)anthracène (7-OHM-12-MBA), le 12-hydroxyméthyl-7-méthylbenz(a)anthracène (12-OHM-7-MBA), le 7,12-dihydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène, le 7,12-dihydroxyméthylbenz(a)anthracène, l'épidioxydiméthylbenz(a)anthracène, le 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène, et le 8,9 diHOH-DMBA.

Ces produits n'ont pas subi de microanalyse ultérieure mais la plupart d'entre eux ont été comparés avec des produits fournis aimablement par le Docteur SIMS avec lesquels ils se sont montrés identiques quant à leur point de fusion, leurs propriétés migratrices en chromatographie sur couche mince dans différents solvants et à leurs propriétés spectrales en lumière ultraviolette.

a) - Synthèse de la benzanthracène-7,12-quinone.

La benzanthracène quinone nous a servi de point de départ pour les synthèses ultérieures.

Elle a été synthétisée par la méthode de Mc MULLEN. Le principe en est la condensation du Naphtalène avec l'anhydride phtalique et le chlorure d'aluminium en milieu benzènique. On réalise ensuite la cyclisation de l'acide cétonique obtenu par l'acide polyphosphorique.



La quinone a été ensuite purifiée par deux recristallisations successives dans les systèmes : éthanol/acétone et toluène/éthanol, le point de fusion du produit obtenu est de 188°C, mesurée sur un banc koffler.

b) - Synthèse du 7,12-dihydroxy-7,12-diméthylbenz(a)-anthracène.

C'est la méthode de BACHMANN et BRADBURY (1938) qui a été utilisée. Elle consiste en l'action d'un organo magnésium préparé à partir d'iodure de méthyl et de bromure de magnésium en milieu rigoureusement anhydride sur la benzanthracène quinone. Le produit a été ensuite recristallisé 3 fois par le méthanol. Le point de fusion obtenu est de 184-186°C.

.../...

c) - Synthèse des 7-hydroxyméthyl-12-méthylbenz(a)-anthracène (7-OHM-12-MBA) et 12-hydroxyméthyl-7-méthylbenz(a)anthracène (12-OHM-7-MBA).
(II et III fig. 15).

Ils ont été synthétisés selon la méthode décrite par BOYLAND et SIMS (1965).

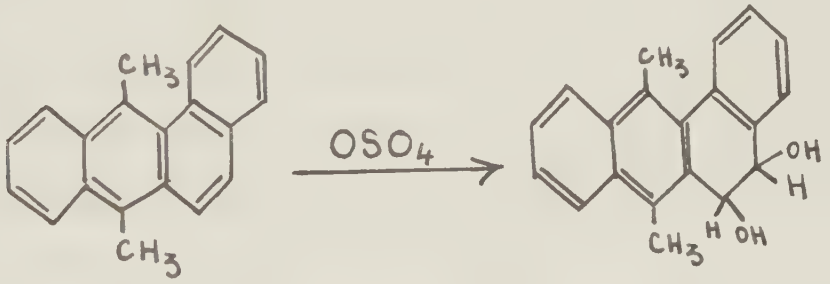
Le DMBA est oxydé par le tétraacétate de plomb en milieu acétique à 100°C. Le précipité gommeux obtenu est alors chromatographié sur une colonne de gel de silice et élué par un mélange de benzène et d'éther de pétrole (1v/1v). Les fractions qui contiennent les dérivés acétoxyméthylés sont évaporées et traitées par l'éther. Les cristaux de 7 acétoxyméthyl précipitent puis ce sont ceux de 12 acétoxyméthyl. Ils sont recristallisés par l'éthanol puis hydrolysés séparément par la potasse en milieu méthanolique. Le 7-OHM-12-MBA et le 12-OHM-7-MBA sont alors recristallisés par l'éthanol. Les points de fusions sont de 161°C pour le 7-OHM-12-MBA et de 164°C pour le 12-OHM-7-MBA. Les figures 16 et 17 montrent les spectres d'absorption de ces deux corps.

d) - Synthèse du 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène.

Il a été préparé par la méthode de COOK et SCHOENTAL (1948) pour la première phase, puis celle, adaptée, de FIESER and FIESER.

.../...

Le principe est l'oxydation de l'hydrocarbure (DMBA) par le tétraoxyde d'osmium en milieu pyridine. Le résidu obtenu est ensuite traité par du sulfite de sodium en milieu dioxane. La solution obtenue est extraite par de l'éther qui est ensuite chassé . Le produit obtenu est recristallisé dans le méthanol : le point de fusion obtenu est de 173°C. (voir spectre d'absorption dans l'ultraviolet fig. 18).



e) - <u>Synthèse du 8,9-dihydro-8,9-dihydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène</u>. (VII fig. 15)

Il n'a pas pu être synthétisé, il a été obtenu en incubant des foies de rats stimulés par le méthylcholanthrène dans des conditions comparables à celles qui seront décrites plus loin. Son spectre est représenté fig. 19.

f) - <u>Synthèse du 7,12-dihydroxyméthylbenz(a)anthracène et du 4-hydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène</u>. (VI et V fig. 15).

Ils n'ont pas été synthétisés, des échantillons fournis aimablement par le Docteur SIMS ayant été uniquement utilisés. Les figures 20 et 21 illustrent les spectres d'absorption de ces deux composés.

2°) - Traitement des animaux.

L'étude du métabolisme du DMBA par des homogénats de foie a été réalisée avec des souris anglaises, C-négatif et IC, âgées de 3 mois, normales ou stimulées.

Dans l'étude du métabolisme par des homogénats de préestomac, d'estomac glandulaire et d'intestin grêle nous avons utilisé des souris C-négatif femelles, âgées de 3 mois (une série d'expériences a été réalisée avec des souris de 5 mois), normales ou stimulées 30 heures avant le sacrifice par 3 mg de 3-méthylcholanthrène (Eastman Kodack LTD) dissous dans 0,2 ml d'huile d'arachide ; des animaux témoins ayant reçu 0,2 ml d'huile d'arachide seule ont été également utilisés. L'huile et le méthylcholanthrène ont été administrés par tubage gastrique grâce à un tube rigide.

3°) - Préparation des homogénats.

a) - Homogénats de foie

Les foies de 25 souris (soit environ 40g de tissu) ont été prélevés sur de la glace, puis homogénéisés par un ultraturrax dans une solution de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 préparé à partir de Na_2HPO_4 0,1 M et de NaH_2PO_4 0,1 M. A ce tampon a été ajouté du chlorure de Potassium à raison de 1,15 %. L'homogénat a été réalisé à la concentration de 10 %. Il a été ensuite centrifugé 20 minutes à 4 800 tours (1480 g). Toutes ces opérations étant effectuées en chambre froide, à + 4°C.

.../...

b) - Homogénats de préestomac et d'estomac glandulaire.

Deux études ont été faites, mais dans les deux cas les homogénats ont été réalisés de la même façon que celle décrite ci-dessus.

c) - Homogénats d'intestin grêle.

Deux études ont également été faites l'une portant uniquement sur des animaux normaux et la seconde étant une comparaison entre le métabolisme d'animaux normaux et celui d'animaux stimulés. Dans la 1ère étude (A) les homogénats ont été réalisés comme décrit plus haut. Dans la seconde (B) l'intestin grêle a été ouvert et la muqueuse en a été grattée et prélevée sur de la glace. L'homogénat a été réalisé par un "Potter Evehjem", broyeur à piston de teflon. Ensuite la technique est identique.

4°) - Incubation des homogénats.

Pour estimer le métabolisme du DMBA nous avons utilisé différentes techniques. Pour le foie nous avons fait appel à du DMBA non tritié et pour les autres organes du DMBA tritié dans l'étude A avec des comptages par spectrophotométrie de scintillation. Dans l'étude B nous avons utilisé, d'une part, du DMBA tritié avec comptage par spectrophotométrie de scintillation, et, d'autre part, du DMBA normal et des techniques de fluorométrie. Ces dernières techniques nous ont également permis d'estimer dans cette même étude le métabolisme du benzo(a)pyrène à titre de contrôle.

.../...

a) - Incubation de foie.

L'homogénat a été dilué volume à volume par du tampon phosphate Kcl et pour 40 g de foie les cofacteurs suivants ont été ajoutés : glucose 6-phosphate (250 mg) et nicotinamide dinucléotide phosphate (NADP) (30 mg). (Ces produits proviennent de Boehringer Manheim - Germany), comme décrit par BOYLAND et SIMS (1965). La préparation (400 ml) a été mise à équilibrer quelques minutes à 37°C dans un bain marie, un courant d'air la traversant et assurant une oxygénation correcte. 10 mg de DMBA (Eastman Kodak) dans 5 ml d'éthanol, ont alors été ajoutés et l'incubation poursuivie 1 heure. L'incubation a ensuite été arrêtée et extraite 3 fois successivement par un volume d'acétate d'éthyle (400 ml). A chaque extraction la préparation a été centrifugée pour séparer la phase organique de la phase aqueuse. L'acétate d'éthyle a ensuite été lavé par de l'eau distillée puis évaporé sous pression réduite. Le résidu a été repris par un peu d'acétate puis chromatographié. Les métabolites ont été repérés par une brève illumination ultraviolette, élués par de l'éthanol et leur spectre d'absorption ultraviolet a été étudié.

b) - Incubation de préestomac, estomac glandulaire et d'intestin grêle.

Etude A - A 10 ml de surnageant, contenant l'équivalent de 1g d'organe, ont été ajoutés 10 ml de la solution tamponnée phosphate, Kcl contenant 7 mg de glucose 6-phosphate (G 6 P),

.../...

1 mg de nicotinamide dinucléotide phosphate (NADP) et 0,01 ml de glucose 6-phosphate deshydrogénase provenant tous les trois de Boehringer ; 5 microgrammes de DMBA tritié dans 0,1 ml d'éthanol, soit $4,5.10^6$ cpm avec un rendement de 20 % environ ont alors été ajoutés, et l'incubation poursuivie 45 minutes. L'incubation a été arrêtée, extraite, comme décrit précédemment, puis la moitié en a été chromatographiée sur gel de silice. Le métabolisme a été estimé par des techniques de spectrophotométrie de scintillation décrites plus loin.

c) - Incubation de préestomac, d'estomac glandulaire et d'intestin grêle.

Etude B - 2 ml de surnageant, soit l'équivalent de 200 mg de tissus frais, ont été incubés en présence de 1,14 mg de G 6 P, 0,5 mg de NADP, comme décrit par DAO et VARELLA, mais dissous dans 2 ml de tampon phosphate Kcl 1,15 %, et 0,01 ml de G 6 P deshydrogénase (5 mg/ml). Ces cofacteurs provenant de Bochringer.

Les substrats, 5 µg de DMBA-^{3}H (Radiochemical Centre Amersham - England 500 mCi/mM) dans 0,1 ml d'alcool, soit 5×10^6 cpm avec un rendement de 20 %, ou 50 µg de DMBA normal (Eastman Kodak, New-York) dans 0,1 ml d'acétone, ou enfin 50 µg de benzo(a)pyrène (BaP) (Koch-Light LTD - Bucks - England) dans 0,1 ml d'acétone, ont été ajoutés. Les incubations, poursuivies 15 et 30 minutes pour le DMBA et 30 minutes pour le BaP, ont été extraites par un volume d'acétate d'éthyle dont la moitié a été chromatographiée.

.../...

5°) - Techniques de chromatographie et de spectrophotométrie de scintillation.

Les chromatographies ont été effectuées sur gel de silice G (Merk Darmstadt Germany) de 0,25 mm d'épaisseur.

La méthode de SIMS et GROVER (1968) a été utilisée pour évaluer le métabolisme du DMBA-^{3}H. Des dérivés "traceurs" 7-OHM-12-MBA (II), 12-OHM-7-MBA (III), 7,12-diOHM-BA (VI) et le 8,9-diHOH-DMBA (VII) ont été ajoutés aux extraits avant d'être chromatographiés dans du benzène contenant 9 % d'éthanol. Le DMBA et les "traceurs" ont été repérés par une brève irradiation ultraviolette, grattés, puis toute la plaque a été découpée en 23 bandes régulières : la figure 22 donne les propriétés chromatographiques de ces traceurs. Au gel de silice sont ajoutés 10 ml de liquide à scintillation : toluène 1925 ml, dioxane 1925 ml, éthanol 1150 ml, naphtalène 80 g/1, 2,5 diphényloxazol (P.P.O) 5 g/1, 1,4 bis-2-(4-méthyl-5-phényloxazolyl)-benzène (diméthyl P.O.P.O.P) 0,5 g/1 et la radioactivité est mesurée directement.

Les comptages ont été effectués dans un Packard tri Carb et le rendement s'est avéré être de l'ordre de 20 %.

6°) - Techniques de fluorométrie.

Elles ont été utilisées pour estimer le métabolisme du DMBA normal et du benz(a)pyrène.

.../...

a) - Métabolisme du DMBA normal : Mesure des métabolites A et B de CONNEY et LEVIN.

Nous avons utilisé la méthode décrite par CONNEY et LEVIN (1966). Les incubations ont été arrêtées par 3 ml d'acétone froid. Les homogénats ont été ensuite soumis à une extraction par 9 ml d'hexane pendant 20 minutes. 3 ml de la solution hexanique ont enfin été extraits par 3 ml de soude normale pendant 1 minute, et la fluorescence des deux métabolites A et B décrits par CONNEY et LEVIN mesurée dans un "Aminco Bowman spectrofluoromètre".

Les coordonnées de fluorescence sont :

- pour le Métabolite A :
  - excitation 320 mμ fluorescence 388 mμ
- pour le Métabolite B :
  - excitation 370 mμ fluorescence 520 mμ

b) - Métabolisme du benzo(a)pyrène : Mesure de la "benzopyrène hydroxylase".

Nous avons estimé la valeur de la "benzopyrène hydroxylase" en mesurant la quantité de 3-hydroxy benzo(a)pyrène (3-OH-BaP) produite, par la méthode de WATTENBERG et Coll (1962) légèrement modifiée.

L'incubation arrêtée par 3 ml d'acétone froid a été extraite par 9 ml d'éther de pétrole (80-100°). Après l'avoir laissée pendant 48 heures à + 4°C dans l'obscurité la totalité de l'éther de pétrole a été extraite à son tour par 3 ml de

.../...

NaOH normale. L'appréciation de la fluorescence, faite dans le même spectrofluoromètre " Aminco Bowman", a été standardisée par une solution de sulfate de quinine, (0,4 µg/ml de H_2SO_4 0,1 N) pour une longueur d'onde d'activation de 400 mµ et de fluorescence de 522 mµ. Une courbe étalon de la fluorescence du 3-OH-BaP (Fig. 23) a été réalisée dans les mêmes conditions grâce à un échantillon aimablement fourni par le Docteur FALK. Cette courbe est droite dans l'intervalle essayé de 0,01 à 1 µg par ml de soude normale. Une unité "benzopyrène hydroxylase" correspond à la formation de 1 µµg de 3-OH-BaP par minute et par mg de tissu frais.

7°) - Spectrophotométrie dans l'ultraviolet.

Les spectres d'absorption ultraviolet ont été réalisés dans deux spectrophotomètres : l'un est un Backman DB l'autre un Unicam SP 800 ; tous les spectres ont utilisé l'éthanol à 95 % comme solvant.

B - RESULTATS

ETUDE A : Métabolisme du DMBA par des homogénats de foie, de préestomac, d'estomac glandulaire et d'intestin grêle.

1°) - Métabolisme du DMBA par des homogénats de foie.

Les résultats obtenus avec les homogénats de foie de souris ne montrent pas de grandes différences avec ceux obtenus

.../...

par BOYLAND et SIMS en 1965 avec des homogénats de foie de rat. Sur les plaques de chromatographie 5 bandes fluorescentes sont retrouvées. Il s'agit tout d'abord du DMBA qui était en excès et qui n'a pas été métabolisé. Ensuite deux bandes fluorescentes de Rf moyen de 0,80 et 0,70, quand la chromatographie est effectuée dans du benzène-éthanol 9 %, sont bien visibles : il s'agit du 12-OHM-7-MBA et du 7-OHM-12-MBA. Leurs spectres d'absorption ultraviolet montrent des pics d'absorption caractéristiques comparables à ceux obtenus avec les produits synthétisés chimiquement. (fig. 16 et 17).

Pour le 12-OHM-7-MBA : 237, 264, 274, 284, 294
344, 359, 375 nm.

Pour le 7-OHM-12-MBA : 235, 265, 273,5, 284, 294
344, 359, 375 nm.

Une quatrième bande fluorescente plus sombre de Rf 0,24 est également isolée. Ses propriétés migratrices et spectrales sont identiques à celles du 8,9-diHOH-DMBA (fig. 19). Son spectre d'absorption a ses principaux pics à 265, 292, 305, 319, 344, et 358 et une inflexion à 284 mμ.

Enfin une cinquième bande de Rf 0,15 semble composée d'un mélange de produits qui n'ont pu être isolés et qui résultent probablement du métabolisme ultérieur des 7-OHM-12-MBA et 12-OHM-7-MBA en acides carboxyliques.

Aucun métabolite portant sur une modification de la région K n'a été isolé, bien que recherché activement, en

.../...

particulier le 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-7,12-DMBA. Le 7,12-diOHM-BA n'a pas été isolé non plus.

Les études sur le foie n'ont pas été poussées plus avant, car elles montraient une très grande similarité avec celles de BOYLAND et SIMS effectuées chez le rat, et, d'autre part, c'est surtout la transformation au niveau des différents segments du tube digestif qui nous semblait intéressante.

2°) - Métabolisme du DMBA par des homogénats de préestomac, d'estomac glandulaire et d'intestin grêle.

Avant tout, il faut noter les variations considérables dans les résultats obtenus d'une incubation à l'autre bien que les conditions expérimentales soient identiques et qu'un grand nombre de souris soit utilisé. Certains homogénats se révèlent très actifs alors que d'autres le sont beaucoup moins ou d'une façon différente quant aux proportions relatives des métabolites produits.

De l'ensemble des résultats (Tableau VI) il se dégage que les homogénats des trois tissus, (fig. 24 et 25) préestomac, estomac glandulaire et intestin grêle sont actifs à un degré comparable pour métaboliser le DMBA. D'autre part, des homogénats préparés à partir de tissus de souris $DBA_2/C_{57}BL$, montrent un pouvoir métabolique comparable à celui des homogénats provenant de souris C négatif. Il semble donc que cette capacité de métaboliser le DMBA ne soit pas liée à une lignée de souris particulière.

.../...

Les principaux produits formés (Tableau VI fig. 24 et 25) sont le 7-OHM-12-MBA (fraction 8), le 12-OHM-7-MBA (fraction 4) et les phénols (probablement les 3-hydroxy-7,12-diméthylbenz(a) anthracène (3-OH-DMBA) et 4-hydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène (4-OH-DMBA)) migrants dans les fractions 5 et 6 et mis en évidence par SIMS et GROVER (1968). Dans ces deux fractions il est également possible que des produits d'oxydation migrent avec les phénols. La preuve de la présence des deux métabolites hydroxyméthylés en 7 et en 12 sera discutée plus loin. Le 8,9-diHOH-DMBA (fraction 17) semble être produit en faible quantité par l'intestin grêle mais pas par les deux parties de l'estomac. Très peu de produits polaires (fractions 18 à 23) correspondant au métabolisme ultérieur des deux dérivés hydroxyméthylés sont produits. Le composé dihydroxyméthylé en 7 et en 12 n'est pas produit non plus.

Dans les fractions 9, 10 et 11 une radioactivité, tantôt très forte, tantôt faible est enregistrée. Il s'agit probablement d'un produit d'oxydation du 7-OHM-12-MBA déjà signalé par BOYLAND et SIMS (1965). Le 7-OHM-12-MBA (fraction 8) migre sur la silice en laissant dans la zone intéressée une radioactivité variable (SIMS : communication personnelle).

Des preuves de la présence des 7-OHM-12-MBA et 12-OHM-7-MBA sont recherchées. Les produits présumés sont élués par l'éther, puis acétylés par l'anhydride acétique en milieu pyridine et enfin rechromatographiés dans du benzène/éthanol 5 % . Une certaine quantité de radioactivité est retrouvée au

.../...

niveau des 7-acétoxyméthyl-12-MBA et 12-acétoxyméthyl-7-MBA. Une grande décomposition des dérivés hydroxyméthylés a lieu lors de l'acétylation laissant des bandes radioactives lors de la migration. Du 7-OHM-12-MBA tritié synthétique, acétylé dans les mêmes conditions, donne un "profil radioactif" en tous points comparables au 7-OHM-12-MBA métabolique, acétylé chimiquement. D'autre part, des incubations réalisées avec des quantités plus importantes de tissus et du DMBA non tritié montrent quand elles sont chromatographiées deux bandes fluorescentes de même "Rf" que les dérivés hydroxyméthylés synthétiques. Ces produits élués par l'éthanol se révèlent être en concentration insuffisante pour obtenir un spectre d'absorption complet. Dans un certain nombre d'expériences cependant, la partie ultraviolette du spectre d'absorption de ces deux produits est obtenue avec ses pics d'absorption caractéristiques à 294, 284 et 273 mμ.

Un petit nombre d'incubations a été effectué également avec des homogénats provenant de souris $C_{57}BL$. L'extrait a été chromatographié d'abord dans du benzène seul. Les bandes correspondant aux dérivés hydroxyméthylés ont été éluées par l'éther puis rechromatographiées avec du benzène/éthanol 5 %. Après ces deux chromatographies dans deux solvants différents, une importante radioactivité est retrouvée associée aux dérivés hydroxyméthylés "traceurs". La présence de ces deux composés semble donc bien établie.

SIMS et GROVER (1968) ainsi que BOYLAND et SIMS (1965) avaient noté l'absence de métabolites portant sur une modification

.../...

de la région K de l'hydrocarbure par des homogénats de foie de rats. Dans nos expériences il n'est pas trouvé non plus de radioactivité importante correspondant au principal métabolite attendu : le trans-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-7,12-diméthylbenz(a)-anthracène (qui migre dans la bande 16). Notons toutefois que ce métabolite est mal isolé car dans cette fraction migrent également d'autres dérivés, des phénols provenant des 7-OHM-12-MBA et 12-OHM-7-MBA.

Remarquons enfin qu'une partie seulement de la radioactivité ajoutée est retrouvée dans la phase organique. Deux explications peuvent être avancées : une liaison de l'hydrocarbure avec certains constituants (protéines en particulier), ou une conversion en métabolites solubles dans l'eau non extraits par l'acétate d'éthyle. Il est probable que ces deux phénomènes se produisent conjointement, nos incubations étant poursuivies un temps assez long. GROVER et SIMS (1968) ont en effet montré qu'une liaison du DMBA pouvait avoir lieu in vitro avec des protéines et de l'acide désoxyribonucléique, tandis que DIAMOND et Coll (1968) mettaient en évidence l'influence du facteur temps sur la conversion du DMBA en métabolites solubles dans l'eau par des cellules en culture.

ETUDE B : Influence du temps d'incubation et de la stimulation "in vivo" sur le métabolisme "in vitro" du DMBA.

.../...

1°) - Influence du temps d'incubation (Tableaux VIII et IX fig. 26)

Cette étude n'a été faite que pour l'intestin grêle. De l'ensemble des résultats il ressort que le temps d'incubation modifie légèrement les résultats.

Chez les animaux normaux, le temps semble favoriser le métabolisme du DMBA. La radioactivité retrouvée au niveau du substrat d'une part, et la radioactivité totale de la phase organique d'autre part sont moindres après 30 minutes d'incubation qu'après 15 minutes.

En termes clairs, cela suggère qu'une quantité plus grande de substrat est transformée, et que sa conversion en métabolites solubles est augmentée. Un peu plus de phénols (fractions 5 et 6) et de produits d'oxydation (fractions 9, 10, 11) dont la nature a été discutée antérieurement, sont constatés après 30 minutes.

Le temps ne paraît pas influer beaucoup sur la production des autres métabolites.

Dans le premier lot d'animaux stimulés, âgés de 3 mois, les mêmes remarques sont à formuler que chez les animaux normaux. De surcroit le temps paraît favorable à la production du 8,9 dihydrodiol (fraction 17).

Dans le deuxième lot constitué de souris âgées de 5 mois il semble que le métabolisme soit beaucoup plus rapide d'emblée. La radioactivité totale de la phase organique, celle

.../...

retrouvée au niveau du DMBA, et celle des principaux métabolites, le 8,9 dihydrodiol en particulier, sont sensiblement les mêmes après 15 mn d'incubation qu'après 30 mn.

Notons cependant qu'au niveau des phénols (fractions 5,6) et des fractions 9, 10, 11 la quantité de radioactivité est plus grande après 30 minutes d'incubation qu'après 15 minutes. Ces derniers résultats sont difficiles à interpréter mais il paraît logique de penser que des phénomènes d'oxydations interviennent à ces deux niveaux, et en rendent la compréhension difficile.

La production des deux métabolites fluorescents A et B n'est pas modifiée par le temps d'incubation, que les animaux soient stimulés ou non (Tableau X fig. 27). Après 15 minutes d'incubation le maximum est atteint.

2°) - Influence de la stimulation par le 3-méthylcholanthrène.

a) - Au niveau du préestomac (Tableau VII, fig. 28)

La stimulation ne paraît pas favoriser la conversion en métabolites solubles dans l'eau, le métabolisme ne semble pas modifié d'une façon considérable.

b) - Au niveau de l'estomac glandulaire (Tableau VII fig. 28)

Une partie plus importante du substrat est transformée en composés solubles dans l'eau sous l'effet du méthylcholanthrène. La distribution de la radioactivité de la phase organique

.../...

ne subit pas de grands changements.

c) Au niveau de l'intestin grêle (Tableaux VII et IX fig. 26).

La modification la plus importante induite par le méthylcholanthrène semble être l'augmentation de la production du 8,9-dihydro-8,9-dihydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène (8,9-diHOH-DMBA). C'est la variation la plus significative, le 8,9 dihydrodiol étant le composé le mieux isolé sur la plaque de chromatographie. Un peu de 7,12-dihydroxyméthylbenz(a)anthracène (7,12-diOHM-BA) (fraction 14) semble également produit par les "homogénats stimulés".

Après 15 minutes d'incubation (Tableau VIII) le 7-hydroxyméthyl-12-méthylbenz(a)anthracène (7-OHM-12-MBA) et le 12-hydroxyméthyl-7-méthylbenz(a)anthracène (12-OHM-7-MBA) sont, par rapport aux souris normales, augmentés dans le premier lot de souris stimulées et diminués dans le deuxième lot. Après 30 minutes d'incubation (Tableau IX) les chiffres sont comparables pour ces deux métabolites. Il semble donc que la stimulation n'influe pas beaucoup sur la production finale de ces deux métabolites mais qu'une quantité plus grande en est formée, et qu'elle est ensuite dégradée plus vite.

La stimulation semble ne pas avoir d'effet très prononcé sur la conversion en métabolites solubles dans l'eau, du moins au point de vue quantitatif.

.../...

Le métabolite B (Tableau X, fig. 27) n'est pas produit, ni par les animaux normaux, ni par les animaux stimulés. Le métabolite A, par contre, est considérablement augmenté par la stimulation et nous discuterons de sa nature plus loin.

La "benzopyrène hydroxylase", (Tableaux VIII et IX) malgré des variations d'un homogénat à l'autre, est assez stable. Ses variations semblent indépendantes de celles enregistrées pour le métabolisme du DMBA, chaque incubation ayant son "témoin BaP hydroxylase".

Ce qui est remarquable c'est l'augmentation importante qui est enregistrée. Sa valeur est environ 15 fois supérieure chez les animaux stimulés que chez les animaux normaux.

C - DISCUSSION

De ces expériences il ressort que des homogénats de préestomac, d'estomac glandulaire et d'intestin grêle sont capables de métaboliser le DMBA.

Les produits majeurs de ce métabolisme sont les dérivés hydroxyméthylés en 7 et en 12. Il ne paraît pas y avoir de métabolisme ultérieur de ces composés, du moins de façon importante. Les autres métabolites possibles, en quantité trop faible ne peuvent être identifiés avec certitude. Il semble que des phénols, les 3 et 4-OH-DMBA probablement, sont formés, mais il est difficile de déterminer la part de radioactivité retrouvée à leur niveau qui revient à des oxydations. Ces oxydations se

.../...

produisent quelles que soient les précautions prises mais il semble que ce soient en grande partie des métabolites qui se dégradent puisque dans les cas d'incubation d'homogénats bouillis il s'en forme beaucoup moins.

Les deux dérivés hydroxyméthylés en 7 et en 12 ont été reconnus comme étant sarcomatogènes chez la souris (BOYLAND et Coll 1965), mais moins que le DMBA lui-même. En outre, leur faculté d'induire des tumeurs mammaires chez le rat est très faible (WHEATLEY et INGLIS 1968). Il apparaît donc comme peu probable que ce soit un de ces métabolites qui soit actif au niveau du préestomac de la souris. De plus l'accoutumance n'est pas une condition nécessaire à la production de tumeurs gastriques par le DMBA ce qui plaide en faveur d'une action directe de ce dernier sur les cellules du préestomac.

Rappelons toutefois que le 7-OHM-12-MBA est plus efficasse que le DMBA pour produire des nécroses surrénaliennes chez des rats et que, d'autre part, il entraine des anomalies de développement du foetus quand il est injecté à des rates gestantes (CURRIE et Coll 1970). Bien que ces effets ne paraissent pas liés à une cancérogénicité on ne peut pas les omettre.

BOYLAND et SIMS 1967 ont montré qu'en ce qui concerne le foie de rat, le prétraitement par le 3-méthylcholanthrène, ou le soudan III affecte principalement la production du 8,9-diHOH-7,12-DMBA et des phénols formés par "ring hydroxylation" ainsi qu'une légère diminution des dérivés hydroxyméthylés en 7 et 12. Au niveau de l'intestin grêle il semble qu'il en soit

.../...

de même, du moins en ce qui concerne la production du 8,9 diol. Les phénols par contre, mal isolés, ne subissent pas de grandes modifications, et les dérivés hydroxyméthylés sont dans un cas augmentés, dans l'autre diminués après 15 mn d'incubation. Après 30 minutes d'incubation les quantités de ces derniers sont comparables, de même que les phases aqueuses. Il semble donc que le 3-méthylcholanthrène produise une accélération du métabolisme de ces deux dérivés, soit en poussant leur dégradation plus loin, soit en augmentant leur vitesse de conversion en produits solubles dans l'eau.

Le 7,12-diOHM-BA n'est pas produit par les animaux normaux, mais l'est par ceux stimulés, en faible quantité.

La "benzopyrène hydroxylase" de l'intestin grêle, elle, est augmentée de façon beaucoup plus nette, bien que des variations soient notées d'un homogénat à l'autre. Il y a donc un contraste frappant entre le relativement peu d'effet de la stimulation sur le métabolisme du DMBA et l'effet beaucoup plus grand sur le métabolisme du BaP, par les mêmes homogénats. (Notons cependant que dans un certain nombre d'expériences réalisées actuellement, une quantité beaucoup plus grande de 8,9 dihydrodiol est recouvrée). D'autre part, il n'est pas mis en évidence de relations directes entre le métabolisme du DMBA tritié et la valeur de la "benzopyrène hydroxylase" qui a été mesurée pour chaque homogénat à titre de contrôle. Cela tient peut être au fait d'une très grande complexité du métabolisme

.../...

du DMBA ou que la stimulation par le méthylcholanthrène n'augmente pas de façon systématique toutes les enzymes microsomiales, métabolisant les hydrocarbures, dans les mêmes proportions.

Il est intéressant de noter que dans nos expériences la "benzopyrène hydroxylase" de l'intestin de souris stimulées atteint la valeur de celle du foie d'animaux normaux (Résultats non publiés). Cela situe l'importance du rôle que peut jouer le tube digestif dans les phénomènes de désintoxication, surtout dans le cas d'ingestions répétées, puisqu'une certaine sommation est possible, comme il est courant dans la vie quotidienne par l'intermédiaire de l'alimentation.

Quant aux métabolites fluorescents A et B de LEVIN et CONNEY, seul le métabolite A est produit par l'intestin grêle des animaux stimulés. En considérant l'ensemble de ces expériences, le métabolite A pourrait être le 8,9 diol car c'est le seul qui soit augmenté de façon importante. D'autre part, ils notent pour le métabolite A, un Rf qui correspond sensiblement au 8,9-diHOH-DMBA chromatographié dans les mêmes conditions. BOYLAND et SIMS 1967 suggèrent également cette possibilité.

De ces expériences il ressort donc que l'on peut mesurer d'une façon assez précise le métabolisme in vitro du DMBA par l'intermédiaire du 8,9-diHOH-DMBA. Est-il possible que ce dernier soit à l'origine des tumeurs mésentériques que nous avons observées précedemment ? Pour répondre à cette question il faudra synthétiser ce corps, le tester au niveau des ganglions

.../...

mésentériques et voir si un caractère lipotrope ou autre le conduirait à se fixer sélectivement au niveau de la graisse du mésentère. GROVER et SIMS (1968) de même que GELBOIN (1969) ont montré que des métabolites d'hydrocarbures aromatiques formés par des enzymes microsomiales sont capables de réagir avec les acides nucléiques et les protéines. Ces métabolites intermédiaires sont probablement des areneoxydes (GROVER et SIMS 1970) qui sont convertis en dihydrodiol par des préparations de microsomes (OESH and DALY 1971, PANDOV et SIMS 1970). Le fait que le 8,9-dihydrodiol soit formé suggère que des époxydes puissent être formés par l'estomac et l'intestin des souris. On ne peut éliminer cette hypothèse, GROVER et Coll (1971) ayant montré que des oxydes du benz(a)anthracène, du dibenz(a,h)anthracène et du 3-méthylcholanthrène sont plus efficaces pour transformer "in vitro" des cellules embryonnaires de hamster que les hydrocarbures parents. Il semble cependant peu vraisemblable que ces époxydes soient responsables des tumeurs induites car il est probable qu'ils ne vivraient pas suffisamment longtemps pour atteindre le mésentère.

Il se peut aussi que ces composés ne soient pour rien dans la cancérisation que nous avons obtenue et que la flore intestinale joue un rôle très important dans ce phénomène, ce qui est actuellement sous investigation.

.../...

II - METABOLISME DU DMBA "IN VIVO".

Dans les paragraphes précédents il a été mis en évidence que des homogénats de foie, d'intestin grêle et d'estomac étaient capables de métaboliser le DMBA "in vitro". Il nous a paru particulièrement intéressant de rechercher la présence des principaux métabolites identifiés : le 7-OHM-12-MBA, le 12-OHM-7-MBA et le 8,9 dihydrodiol et de voir si une accumulation de ces métabolites ne se produirait pas au niveau des organes que nous étudions. Nous avons voulu voir également si la stimulation enzymes microsomiales par une ingestion préalable de 3-méthylcholanthrène pouvait modifier ces données et jouer un rôle important sur l'élimination du DMBA quand celui-ci est administré à long terme. Pour ce faire, une étude a été entreprise sur la cinétique d'élimination de l'hydrocarbure administré oralement, et sur la recherche des trois métabolites cités plus haut, au niveau des principaux organes du tractus digestif. Il était d'autre part intéressant d'essayer de déterminer la part jouée par le tube digestif dans le phénomène général de désintoxication de l'organisme.

A - MATERIEL ET METHODE

Animaux : Les animaux utilisés étaient des souris IC (Institut du Cancer) femelles âgées de trois mois.

Produits chimiques :

Le DMBA uniformément marqué au tritium provenait d'Amersham (England) et du C.E.A. (Commissariat à l'Energie

.../...

Atomique) de Saclay. Du DMBA (Schuchard), non marqué, a été utilisé pour les dilutions isotopiques. Ces trois types de DMBA ont été purifiés par chromatographie sur couche mince de gel de silice en utilisant le benzène comme solvant. Leur pureté, après purification, a été estimée à 96-97 %. Les animaux prétraités ont reçu 2 mg de 3-méthylcholanthrène (Schuchard). Ces substances, dissoutes dans 0,2 ml d'huile d'olive (Codex) ont été administrées par tubage gastrique à l'aide d'une sonde métallique.

Hydrolyse des tissus :

Les organes, prélevés isolément, ont été lavés avec un coton imbibé d'acétone, découpés en fins morceaux, puis hydrolysés par 10 ml de potasse aqueuse à 10 % et 10 ml d'éthanol à 95 %. L'hydrolyse a été poursuivie pendant 3 heures à 60°C dans un bain marie à agitation mécanique.

Pour déterminer les quantités de radioactivité non éliminées par les souris, celles-ci ont été sacrifiées à des intervalles de temps déterminés après l'administration du DMBA, découpées aux ciseaux, homogénéisées par un broyeur (Ultraturrax) et enfin hydrolysées par 200 ml de potasse alcoolique dans les mêmes conditions que pour les organes. Des souris témoins ont été traitées de la même façon, excepté que le DMBA radioactif a été ajouté à l'homogénat, une fois celui-ci réalisé.

Collecte des urines et des fèces :

Les souris ont été réparties dans des cages (5 par cage) à double fond, le premier constitué d'un fin grillage

.../...

retenant les fèces et le second tapissé d'un papier filtre recueillant les urines.

Extraction des hydrolysats, des urines et des fèces.

Les hydrolysats d'organes ont été extraits par un volume d'acétate d'éthyle. Celui-ci a ensuite été lavé par un volume d'eau puis séché sur du sulfate de sodium.

Les papiers tapissant les cages et ayant retenu les urines ont été élués à deux reprises par un mélange constitué de 20 ml d'acétate d'éthyle et de 20 ml d'eau, les cages ayant été rincées au préalable par ces mêmes mélanges. Les fèces ont également été extraits deux fois par 30 ml d'un mélange d'acétate d'éthyle et d'eau (1v/1v). La suite a été effectuée comme décrit précedemment.

Chromatographies :

Les chromatographies ont été réalisées sur couche mince de gel de silice (Merk, Darmstadt, Germany), avec un mélange de benzène et d'éthanol (9v/1v) comme solvant mobile. Du 7-hydroxyméthyl-12-méthylbenz(a)anthracène (7-OHM-12-MBA), du 12-hydroxyméthyl-7-méthylbenz(a)anthracène (12-OHM-7-MBA) et du 8,9-dihydro-8,9-dihydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène obtenus en incubant des foies de rat ont été ajoutés aux extractions pour servir de marqueurs sur les chromatographies. Les marqueurs ont été repérés sur les plaques par leur fluorescence à 354 nm. Le gel de silice de chaque plaque a ensuite été gratté

.../...

en 20 bandes parallèles aux marqueurs, dont la radioactivité a été comptée directement (voir SIMS et GROVER 1968). Ont été considérés comme métabolites tous les produits migrants sur la plaque du départ au 12-OHM-7-MBA. Les fractions les moins polaires étant constituées par le DMBA et son photoxyde.

Détermination de la radioactivité :

La détermination de la radioactivité des divers extraits a été effectuée dans un compteur à scintillation liquide Nuclear Chicago Mark II, en utilisant un mélange de diméthyl P.O.P.O.P. et de P.P.O. en solution dans du toluène et de l'éthanol absolu. Les comptages ont été effectués sur des fractions aliquotes (10 fois 0,1 ml) après une soigneuse homogénéisation des échantillons. Le Quenching a été déterminé par la méthode du rapport des canaux et il en a été tenu compte dans les résultats qui suivent (excepté pour les chromatographies).

B - RESULTATS

1°) - Elimination du DMBA de l'organisme.

Chaque souris a reçu 1 mg de DMBA dilué isotopiquement avec 37 µg de DMBA uniformément marqué au tritium à raison de 109 mCi/mM.

La figure 29 montre la teneur en radioactivité des souris normales ou prétraitées, sacrifiées à des temps déterminés après l'administration du DMBA-^{3}H, et la radioactivité totale

.../...

excrétée par les urines et les fèces. Cette figure met en évidence la décroissance rapide de la radioactivité dans l'organisme des souris, surtout entre 4 et 15 heures. 24 heures après l'ingestion de l'hydrocarbure il ne reste plus qu'environ 10 % de celui-ci. Il est a remarqué qu'un plateau est alors atteint et que la décroissance devient très lente. De plus les courbes relatives aux souris normales et aux souris stimulées sont semblables ; ceci indique que le prétraitement par le 3-méthylcholanthrène n'a pas d'effet quantitatif sur l'élimination du DMBA dans nos conditions expérimentales. Cette similarité de réponse entre les souris normales et les souris prétraitées se retrouve également au niveau des voies d'élimination (dans les urines et dans les fèces). Parallèlement à la décroissance de la radioactivité des souris une augmentation de l'excrétion est enregistrée. Il faut remarquer cependant que cette augmentation se manifeste avec deux heures de retard. Ce retard ne semble pas être en rapport avec l'élimination de l'hydrocarbure mais avec une élimination du tritium sous forme d'eau dont la nature sera discutée plus loin. Ceci explique que la dose totale de radioactivité ingérée n'ait pas été entièrement recouvrée dans ces expériences.

La figure 30 fait état des résultats concernant l'élimination sous ses différentes formes. La technique utilisée ayant permis de séparer une phase aqueuse* et une phase organique*

---

* Par "Phase aqueuse" on comprendra : Substances non extraites par les solvants organiques (acétate d'éthyle) et/solubles dans l'eau.

et par "Phase organique" : substances extraites par les solvants organiques (acétate d'éthyle).

pour les fèces et les urines. Cette figure met en relief que c'est par les fèces que l'excrétion est la plus abondante. L'excrétion se fait essentiellement sous forme de "phase organique" par les fèces et de "phase aqueuse" par les urines.

Le prétraitement par le 3-méthylcholanthrène semble favoriser la conversion du DMBA en produits solubles dans l'eau, les phases aqueuses des urines et des fèces étant plus importantes chez les souris stimulées que chez les souris normales. Il faut noter toutefois que le rapport urine/fèces n'est pas changé de façon sensible. Si l'élimination globale de l'hydrocarbure n'est pas modifiée par la stimulation, elle l'est d'une façon notable quant aux métabolites isolés dans les phases organiques des fèces et des urines.

L'analyse chromatographique des phases organiques (fig. 31) montre en effet que le pourcentage de métabolites est plus élevé chez les souris stimulées que chez les souris normales, tant dans les fèces (46 % contre 25 %) que dans les urines (56 % contre 38 %).

Dans les fèces de souris normales les métabolites se répartissent d'une façon sensiblement uniforme le long de la plaque de chromatographie sans prédominance marquée. Dans les fèces des animaux stimulés le profil radioactif est similaire mais à un niveau légèrement plus élevé. Dans les urines on note surtout la présence de produits polaires, qui sont notablement augmentés par la stimulation des animaux. Ces produits polaires

.../...

sont dans une région ou migrent en particulier les acides carboxyliques résultant, entre autres, du métabolisme des dérivés hydroxyméthylés. (SIMS et GROVER 1968).

2°) - Distribution des métabolites dans les principaux organes du tractus digestif.

Les souris ont reçu 30 µCi de DMBA tritié (10 000 mCi/mM). Les organes ont été prélevés, hydrolysés et les extraits par l'acétate d'éthyle chromatographiés comme décrit dans le chapitre "Matériel et Méthode".

Le tableau XI met en évidence qu'un certain pourcentage de métabolites est retrouvé dans les phases organiques de l'estomac, de l'intestin grêle et du foie. Rappelons que ces organes sont capables de métaboliser le DMBA "in vitro". C'est le foie qui contient le taux de métabolites le plus élevé. Celui-ci se maintient assez constant dans le foie et le préestomac même 15 heures après l'administration du DMBA. Par contre il décroit rapidement dans l'estomac glandulaire et l'intestin grêle, et ne peut plus être estimé 8 heures après l'ingestion de l'hydrocarbure. Un fait est à souligner, c'est l'absence de métabolite en quantité appréciable dans le mésentère. Le prétraitement par le méthylcholanthrène n'affecte pas de façon importante ces données.

Les proportions de 7-OHM-12-MBA, de 12-OHM-7-MBA et de 8,9-diHOH-DMBA ont été calculées par rapport à la quantité totale des métabolites retrouvés (Tableau XII). Les 7-OHM-12-MBA

.../...

et 12-OHM-7-MBA sont relativement plus abondants dans l'estomac et l'intestin grêle que dans le foie. Pour le 8,9-diHOH-DMBA c'est l'inverse, il est le métabolite le plus abondant dans le foie. Il est à noter également que la stimulation par le méthylcholanthrène n'affecte que la production du dihydrodiol. Celui-ci est légèrement augmenté dans l'intestin grêle et le foie. Cette augmentation n'est décelable que 4 heures après l'ingestion du DMBA et est assez fugitive dans l'intestin grêle.

C - DISCUSSION

DANIEL et PRATT (1967) ont montré que 20 à 30 % du tritium du DMBA était séparé de l'hydrocarbure marqué et éliminé sous forme d'eau tritiée dans l'urine. Ceci peut expliquer que le total de radioactivité ingérée n'a pas été retrouvée puisque cette eau n'a pas été mesurée. Il est possible qu'elle ait lieu très précocement entre le 4e et le 8e heure après le tubage car on remarque une perte de radioactivité des souris entières d'environ 25 % alors que l'excrétion est extrêmement réduite. Cependant les pertes d'eau émises sous forme de vapeur (respiration, perspiration etc ...) ont été captées pendant des laps de temps déterminés. En admettant que cette forme d'élimination soit constante et que l'on puisse extrapoler, c'est environ 2 à 2,5 % de la radioactivité ingérée qui est excrétée.

LEVIN et CONNEY (1967) ont montré qu'un prétraitement par le méthylcholanthrène stimulait le métabolisme du DMBA par des préparations de foie, en ses dérivés mono hydroxyméthylés

.../...

ainsi que leur métabolisme ultérieur en produits polaires. Ils ont constaté d'autre part, de même que JELLINCK et SMITH (1969), une augmentation des métabolites solubles dans l'eau non extrait par les solvants organiques. SIMS pour sa part (1970 c) note qu'un prétraitement par le méthylcholanthrène augmente de façon considérable la production du 8,9-dihydro-8,9-dihydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène par des homogénats de foie alors que celle des dérivés hydroxyméthylés est peu affectée. Les résultats rapportés ici sont en accord avec ces expériences conduites "in vitro". Le prétraitement par le méthylcholanthrène s'il n'a pas modifié quantitativement de façon importante l'excrétion du DMBA l'a modifié qualitativement. Les métabolites solubles dans l'eau sont plus abondants de même que les produits polaires des phases organiques. Les phases aqueuses n'ont pas été systématiquement étudiées, cependant l'hydrolyse acide de celles-ci a libéré des quantités importantes de radioactivité qui n'ont pu être identifiées. Il est probable que cette radioactivité est liée à des métabolites excrétés conjugués. BOYLAND et SIMS (1962 a, 1962 b) ont en effet rapporté qu'une telle conjugaison avait lieu avec le phénanthrène, alors que FALK (1962-1963) montrait que le benzo(a)pyrène était excrété par le système hépatobiliaire après hydroxylation et conjugaison des composés apparentés. Notons cependant qu'une partie importante de DMBA a été retrouvée libre dans les urines. Il n'est pas impossible que son transport ait été effectué conjugué et qu'il se soit trouvé découplé tardivement avant d'être excrété.

..../...

Quant au tube digestif, son rôle dans la désintoxication de l'organisme semble non négligeable quand la substance est administrée oralement. La grande quantité de radioactivité retrouvée associée au DMBA dans les fèces peut s'expliquer par le fait qu'une partie seulement de l'hydrocarbure est absorbée, le reste étant excrété directement, inchangé, avec les métabolites empruntant les voies hépatobiliaires (LO SIN MAO 1965). D'autre part, d'après les résultats rapportés ici il semble que le DMBA soit déjà partiellement métabolisé au niveau des muqueuses digestives avant d'être distribué par la lymphe et le sang (DANIEL et PRATT 1967). Ceci peut être d'une grande importance, la muqueuse digestive représentant souvent la première barrière défensive de l'organisme. Le problème reste posé d'ailleurs de savoir sous quelle forme l'hydrocarbure se trouve transporté dans l'organisme ensuite.

Enfin, il semble peu probable qu'un des métabolites identifiés soit responsable des tumeurs gastriques et mésentériques observées. En particulier l'absence de métabolite décelable dans le mésentère suggère que le DMBA dans sa forme primitive puisse agir à son niveau. Ceci est à rapporcher des résultats de FLESHER (1967) qui pense que le DMBA inchangé peut être responsable des tumeurs mammaires induites chez le rat par le DMBA. Il ne détecte que peu de métabolites dans les tissus intéressés et une quantité importante de DMBA. On ne peut cependant écarter l'hypothèse d'un métabolite à courte vie, non décelé ; du type areneoxyde

.../...

décrit par GROVER et SIMS (1970) ou ayant la propriété de réagir avec les acides nucléiques et les protéines (GROVER et SIMS 1968, GELBOIN 1969) comme il a été fait mention précedemment.

RESUME DU TROISIEME CHAPITRE

Ce chapitre décrit, dans un premier temps, le métabolisme du DMBA "in vitro" par des homogénats de foie, d'estomac et d'intestin grêle de souris normales et stimulées par le 3-méthylcholanthrène et, dans un deuxième temps, la cinétique d'excrétion du DMBA "in vivo", ainsi que la distribution des principaux métabolites dans le tube digestif.

Il a été mis en évidence que les préparations de foie de souris métabolisaient le DMBA de la même façon que des préparations de foie de rats. Des homogénats de préestomac, d'estomac glandulaire et d'intestin grêle se sont montrés capables eux aussi de dégrader "in vitro" le DMBA. Les principaux métabolites isolés ont été le 7-hydroxyméthyl-12-méthylbenz(a)-anthracène et le 12-hydroxyméthyl-7-méthylbenz(a)anthracène. Le production de phénols : les 3 et 4-OH-DMBA est probable, mais très peu de produits polaires ont été formés.

La stimulation "in vivo" s'est montré inefficace sur le métabolisme "in vitro" du DMBA par des homogénats de préestomac et d'estomac glandulaire. Par contre elle a augmenté la production du 8,9-diHOH-DMBA par des homogénats d'intestin grêle.

.../...

La mesure des métabolites A et B décrits par LEVIN et CONNEY a montré que seul le métabolite A était produit, et ceci par les animaux stimulés uniquement. Il a été fait un rapprochement entre ce métabolite A et le 8,9 dihydrodiol.

La stimulation s'est montrée plus efficace et plus importante dans ses effets pour activer le métabolisme du BP que celui du DMBA.

L'étude in vivo de la cinétique d'excrétion de l'hydrocarbure administré oralement a révélé que celui-ci était éliminé rapidement au début, surtout par les fèces, essentiellement sous forme de dérivés solubles dans les solvants organiques et par les urines, essentiellement sour forme de dérivés solubles dans l'eau, puis très lentement ensuite. Le prétraitement par le méthylcholanthrène a eu pour effet d'augmenter la proportion de métabolites retrouvés dans les urines et les fèces, en particulier ceux solubles dans l'eau et ceux très polaires. Au niveau des différents organes du tractus digestif c'est dans le foie que la quantité de métabolites retrouvée à été la plus grande, mais leur présence a été détectée en proportion non négligeable dans l'estomac et l'intestin grêle. Aucun métabolite n'a été décelé dans le mésentère. La stimulation par le 3-méthylcholanthrène a eu peu d'effet, seule la production du 8,9-dihydrodiol s'est accrue dans le foie et l'intestin grêle.

.../...

TABLEAU VI

RADIOACTIVITE DES FRACTIONS OBTENUES APRES CHROMATOGRAPHIE DES EXTRAITS ORGANIQUES DES HOMOGENATS APRES INCUBATION

(en cpm/mn x 10^3)

Fractions Obtenues par Chromatographie		HOMOGENATS DE TISSUS INCUBES					
		PREESTOMAC		ESTOMAC GLANDULAIRE		INTESTIN GRELE	
		Homogénats Bouillis (2)*	Homogénats Normaux (4)*	Homogénats Bouillis (2)*	Homogénats Normaux (5)*	Homogénats Bouillis (3)*	Homogénats Normaux (5)*
MBA	1	1935(1830-2040)**	840(613-957)	1333(1315-1350)	689(626-730)	1903(1625-2100)	952(667-1185)
	2	14 (17-11)	25 (15-28)	22 (16-26)	25 (19-34)	11 (9-14)	56 (52-117)
	3	13 (19-7)	31 (12-45)	16 (14-18)	27 (15-32)	7 (5-8)	49 (28-69)
12-OHM-7-MBA	4	16 (16-15)	56 (33-72)	15 (14-16)	36 (25-51)	17 (13-19)	54 (23-106)
	5	13 (20-6)	58 (12-90)	22 (17-27)	49 (18-64)	9 (4-12)	96 (68-130)
	6	21 (28-14)	76 (57-106)	31 (27-34)	55 (31-73)	9 (6-11)	90 (43-150)
	7	9 (11-7)	16 (11-22)	11 (8-14)	24 (12-48)	5 (4-6)	22 (13-49)
7-OHM-12-MBA	8	15 (17-13)	27 (22-29)	18 (15-20)	41 (23-60)	17 (17-14)	39 (29-51)
	9	16 (23-8)	265 (27-313)	46 (43-48)	145(28-205)	10 (8-13)	319 (283-362)
	10	32 (18-45)	148 (52-312)	45 (38-51)	82 (36-137)	10 (8-11)	88 (45-132)
	11	6 (4-8)	19 (7-43)	9 (8-10)	26 (7-97)	5 (4-8)	13 (6-30)
	12	4 (3-5)	6 (4-9)	6 (5-7)	7 (4-17)	3 (3-4)	8 (4-15)
	13	7 (5-8)	5 (4-5)	5 (5-5)	5 (3-7)	3 (3-4)	6 (4-9)
7,12-diHOH-DMBA	14	5 (4-6)	7 (5-10)	7 (7-7)	7 (5-8)	5 (4-6)	7 (5-8)
	15	8 (8-9)	6 (5-8)	9 (7-11)	6 (4-8)	6 (4-9)	9 (6-13)
	16	2 (1-3)	5 (2-7)	6 (4-7)	5 (3-8)	3 (2-5)	7 (4-9)
8,9-diHOH DMBA	17	3 (2-3)	3 (2-5)	5 (4-5)	4 (2-7)	1 (1-2)	5 (3-8)
	18	2 (1-2)	3 (1-5)	3 (3-3)	4 (2-5)	2 (1-3)	5 (3-9)
	19	1 (1-1)	3 (1-4)	3 (3-3)	4 (1-9)	1 (1-1)	5 (3-9)
	20	1 (1-1)	2 (1-3)	2 (2-2)	4 (2-10)	1 (1-1)	5 (3-9)
	21	1 (1-1)	3 (2-4)	4 (4-3)	5 (2-13)	1 (1-1)	4 (3-6)
	22	2 (1-2)	4 (2-6)	5 (5-4)	9 (4-26)	1 (1-1)	6 (4-9)
ORIGINE	23	9 (2-15)	8 (4-11)	16 (18-14)	17 (11-28)	3 (2-4)	19 (12-13

* Nombres d'Expériences ** Mesures extrêmes

TABLEAU VII

RADIOACTIVITE DES FRACTIONS CHROMATOGRAPHIQUES DES EXTRAITS ORGANIQUES DES HOMOGENATS DE PREESTOMAC ET D'ESTOMAC GLANDULAIRE DE SOURIS NORMALES, INCUBEES 30 MN (cnegs/mn x 10^{-3})

Fractions Obtenues par Chromatographie	TRAITEMENT DES ANIMAUX			
	PREESTOMAC		ESTOMAC GLANDULAIRE	
	Normaux (2)*	Stimulés (2)*	Normaux (2)*	Stimulés (2)*
1 DMBA	1444(1362-1525)**	1404(1366-1442)	1629(1593-1664)	1223(1220-1226)
2	15(14-15)	21(17-25)	23(18-27)	28(25-31)
3	7(6-8)	9(8-10)	7(5-8)	11(8-14)
4 12-OHM-7-MBA	26(25-26)	33(29-36)	46(35-56)	37(32-42)
5	80(66-93)	95(92-97)	84(83-85)	84(82-86)
6	154(145-163)	128(118-138)	106(104-107)	72(66-77)
7	10(9-11)	12(11-12)	26(26-26)	12(11-13)
8 7-OHM-12-MBA	30(26-34)	25(25-25)	21(18-24)	19(18-20)
9	107(63-151)	96(45-146)	8(7-9)	8(5-11)
10	125(101-149)	242(233-251)	6(5-7)	130(116-143)
11	18(10-25)	77(63-90)	176(160-192)	170(147-193)
12	5(4-5)	8(7-9)	97(72-121)	22(5-39)
13	3(3-3)	6(4-7)	19(7-31)	4(3-5)
14 7,12-diOHM-MB	6(5-6)	8(7-9)	13(12-13)	9(8-9)
15	9(8-9)	6(5-7)	8(6-9)	3(2-3)
16	4(4-4)	3(2-3)	4(4-4)	2(1-3)
17 8,9-diHOM-7,12-DMBA	3(2-3)	4(3-5)	3(2-3)	5(4-5)
18	2(2-2)	2(2-2)	2(1-2)	2(2-2)
19	2(1-2)	1(1-1)	1(1-1)	2(1-2)
20	2(1-2)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
21	1(1-1)	2(2-2)	1(1-1)	1(1-1)
22	2(1-2)	2(1-2)	1(1-1)	1(1-1)
23 ORIGINE	11(7-15)	6(6-6)	5(5-5)	3(3-3)

* Nombre d'Expériences ** Mesures extrêmes

TABLEAU VIII

RADIOACTIVITE DES FRACTIONS OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE DES EXTRAITS ORGANIQUES DES HOMOGENATS D'INTESTIN GRELE DE SOURIS NORMALES ET DE SOURIS STIMULEES PAR LE METHYLCHOLANTHRENE INCUBES 15 MN (en cpm/mn x 10^{-3}), et BENZOPYRENE HYDROXYLASE DES MEMES HOMOGENATS (µµg/3-OHBaP/mg mn)

Fractions Obtenues par Chromatographie		Homogénats Bouillis (4)*	TRAITEMENT DES ANIMAUX			
			Huile d'arachide (4)*	Normaux (4)*	Stimulés 1er Lot (5)*	Stimulés 2e Lot (5 mois (5)*
DMBA	1	1763(1720-1865)**	1607(1545-1645)	1541(1390-1640)	1580(1525-1780)	1161(1020-1320)
	2	9(6-15)	14(10-19)	22(17-29)	23(17-30)	19(16-20)
	3	6(5-7)	10(9-14)	9(5-11)	17(12-28)	12(7-15)
12-OHM-7-MBA	4	17(16-18)	21(18-24)	24(21-30)	44(33-69)	21(16-25)
	5	10(7-13)	47(36-64)	50(32-68)	43(38-56)	34(20-44)
	6	12(11-13)	75(58-85)	45(31-67)	42(31-64)	27(21-37)
	7	9(7-9)	13(11-14)	7(3-10)	10(7-12)	9(6-18)
7-OHM-12-MBA	8	12(10-15)	19(15-21)	21(15-26)	36(19-63)	17(14-19)
	9	10(7-13)	44(20-89)	75(27-133)	69(40-85)	9(7-12)
	10	12(9-17)	82(62-103)	57(22-110)	42(17-68)	50(44-55)
	11	15(16-18)	30(20-45)	6(6-9)	6(5-9)	30(16-50
	12	9(5-15)	5(4-7)	5(4-6)	5(3-6)	6(4-7)
	13	9(6-13)	4(3-4)	5(4-5)	5(2-7)	6(4-9)
7,12-diOHM DMBA	14	8(6-12)	4(4-5)	8(7-9)	10(8-14)	8(7-10)
	15	7(5-9)	8(7-10)	7(5-9)	5(4-6)	3(2-6)
	16	3(2-4)	4(2-4)	3(2-4)	2(2-3)	4(3-6)
8,9-diHOH DMBA	17	2(1-2)	2(2-8)	4(3-5)	7(5-8)	10(8-13)
	18	2(2-3)	3(2-3)	2(2-3)	2(1-2)	4(3-5)
	19	2(1-2)	2(1-4)	2(2-2)	2(2-2)	2(1-3)
	20	2(1-2)	2(2-2)	2(2-2)	2(1-3)	2(1-2)
	21	2(1-2)	2(2-2)	2(1-3)	2(2-4)	2(1-3)
	22	3(2-3)	3(2-3)	3(2-4)	4(3-5)	3(2-4)
ORIGINE	23	12(10-12)	7(6-8)	20(15-25)	20(16-23)	14(12-16)
OHase		-	10,50	10,78	147,50	150,50

* Nombre d'Expériences ** Mesures Extrêmes

TABLEAU IX

RADIOACTIVITE DES FRACTIONS OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE DES EXTRAITS ORGANIQUES DES HOMOGENATS D'INTESTIN GRELE DE SOURIS NORMALES ET DE SOURIS STIMULEES PAR LE METHYLCHOLANTHRENE , INCUBES 30 MN (en $cpm/mn \times 10^3$). et BENZOPYRENE HYDROXYLASE DES MEMES HOMOGENATS ($\mu\mu g/3\text{-OHBaP/mg/mn}$

Fractions Obtenues par Chromatographie		Homogénats Bouillis (4)*	TRAITEMENT DES ANIMAUX			
			Huile d'arachide (4)*	Normaux (10)*	Stimulés 1er Lot (4)*	Stimulés 2e Lot (5 mois (5)*
DMBA	1	1699(1625-1730)**	1406(1379-1465)	1183(938-1325)	1130(1070-1165)	1122(945-1330)
	2	9(5-13)	20(11-32)	42(23-88)	29(24-31)	19(12-25)
	3	5(4-7)	12(7-15)	21(8-37)	21(9-29)	8(6-13)
12-OH-7-MBA	4	15(13-17)	24(21-31)	28(12-60)	31(25-39)	28(15-35)
	5	13(10-16)	64(44-87)	65(35-104)	57(44-67)	56(46-68)
	6	12(9-14)	104(74-128)	65(41-105)	66(59-81)	55(38-73)
	7	9(7-10)	16(12-26)	12(7-20)	14(8-23)	11(9-13)
7-OHM-12-MBA	8	12(10-13)	22(20-23)	14(9-21)	19(16-21)	15(12-17)
	9	9(7-10)	39(21-59)	51(9-113)	16(9-28)	19(7-27)
	10	17(20-23)	179(115-217)	121(60-237)	97(19-213)	103(59-131)
	11	13(7-18)	88(49-151)	48(3-101)	92(28-153)	60(35-96)
	12	7(5-10)	14(7-29)	6(3-11)	11(6-19)	9(6-12)
	13	7(5-9)	5(4-7)	5(3-6)	7(5-9)	7(5-9)
7,12-diOHM-BA	14	5(4-8)	6(5-7)	6(3-8)	12(11-13)	8(6-10)
	15	6(4-9)	10(9-10)	6(5-10)	1(1-2)	3(2-5)
	16	5(4-6)	5(5-5)	4(2-7)	2(1-4)	5(4-7)
8,9-diHOH-DMBA	17	2(1-3)	3(2-3)	4(3-5)	15(11-19)	9(7-13)
	18	2(1-3)	3(2-4)	2(1-3)	4(3-5)	4(3-5)
	19	2(1-2)	2(2-3)	2(2-4)	3(2-4)	3(2-3)
	20	2(1-2)	3(2-4)	2(2-3)	3(2-4)	2(2-3)
	21	2(1-2)	2(2-2)	3(2-4)	2(1-3)	2(2-3)
	22	2(2-3)	2(2-3)	4(3-10)	2(1-3)	3(3-4)
ORIGINE	23	12(10-14)	6(5-8)	16(12-19)	16(13-19)	21(20-22)
BPOHase		-	10,53	13,51	183,12	150,75

* Nombre d'Expériences ** Mesures extrêmes

TABLEAU X - VALEURS MOYENNES DE LA PRODUCTION DES METABOLITES FLUORESCENTS A ET B APRES 15 ET 30 MN D'INCUBATION DES HOMOGENATS D'INTESTIN GRELE. (En unités arbitraires de fluorescence).

tabolites uorescents	TEMPS D'INCUBATION				
	15 mn		30 mn		
	Homogénats souris normales (5)*	Homogénats souris stimulées (8)*	Homogénats souris normales (5)*	Homogénats souris stimulées (8)*	Homogénats bouillis (8)*
A	68	105	50	108	53
B	70	72	74	77	73

* - Nombre d'expériences.

TABLEAU XI - POURCENTAGE DE RADIOACTIVITE, AUTRE QUE CELLE DUE AU DMBA, PAR RAPPORT A LA RADIOACTIVITE TOTALE RETROUVEE SUR LA PLAQUE DE CHROMATOGRAPHIE.

Chaque point est la moyenne de trois mesures individuelles.

ORGANES	SOURIS	HEURES DU PRELEVEMENT APRES LE TRAITEMENT			
		2 heures	4 heures	8 heures	15 heures
Préestomac	Normales	26	26	23	31
	Stimulées	25	27	28	24
Estomac glandulaire	Normales	26	27	± *	- **
	Stimulées	29	27	±	-
Intestin grêle	Normales	29	13	±	±
	S timulées	18	19	±	±
Foie	Normales	64	60	66	55
	Stimulées	44	44	64	63
Mésentère	Normales	-	±	±	±
	Stimulées	-	±	-	-

La radioactivité enregistrée pour les métabolites est :

* ± : très peu différente de 2,5 fois le bruit de fond

** - : inférieure à 2,5 fois le bruit de fond.

TABLEAU - XII- Pourcentage de radioactivité enregistrée au niveau des différents métabolites par rapport à la radioactivité totale des métabolites, après chromatographie sur plaque (voir texte).

ORGANE	METABOLITES	HEURES DU PRELEVEMENT APRES LE TRAITEMENT							
		2 H.		4 H.		8 H.		15 H.	
		S. normales	S. stimulées	S. normales	S. stimulées	S. normales	S. stimulées	S. normales	S.stimulée
PREESTOMAC	7OHM-12MBA	15	15	17	14	13	11	12	16
	12OHM-7MBA	19	11	12	9	10	10	12	15
	8,9diHOH DMBA	5	4	4	4	4	4	3	4
ESTOMAC GLANDULAIRE	7OHM-12MBA	10	13	15	14	-	-	-	-
	12OHM-7MBA	16	12	13	12	-	-	-	-
	8,9diHOH DMBA	6	4	4	7	-	-	-	-
INTESTIN GRELE	7OHM-12MBA	11	13	10	8	-	-	-	-
	12-OHM-7MBA	11	11	12	6	-	-	-	-
	8,9diHOH DMBA	9	5	7	17	-	-	-	-
FOIE	7OHM-12MBA	7	8	8	8	5	6	8	6
	12-OHM-7MBA	6	6	4	5	5	5	5	6
	8,9diHOH DMBA	16	16	20	27	9	12	5	8
MESENTERE	7OHM-12MBA	-	-	-	-	-	-	-	-
	12-OHM-7MBA	-	-	-	-	-	-	-	-
	8,9diHOH-DMBA	-	-	-	-	-	-	-	-

Spectre d'absorption dans l'ultraviolet du 7-hydroxyméthyl-12-méthylbenz(a)anthracène (7-OHM-12-MBA dans l'éthanol.

Fig. 16

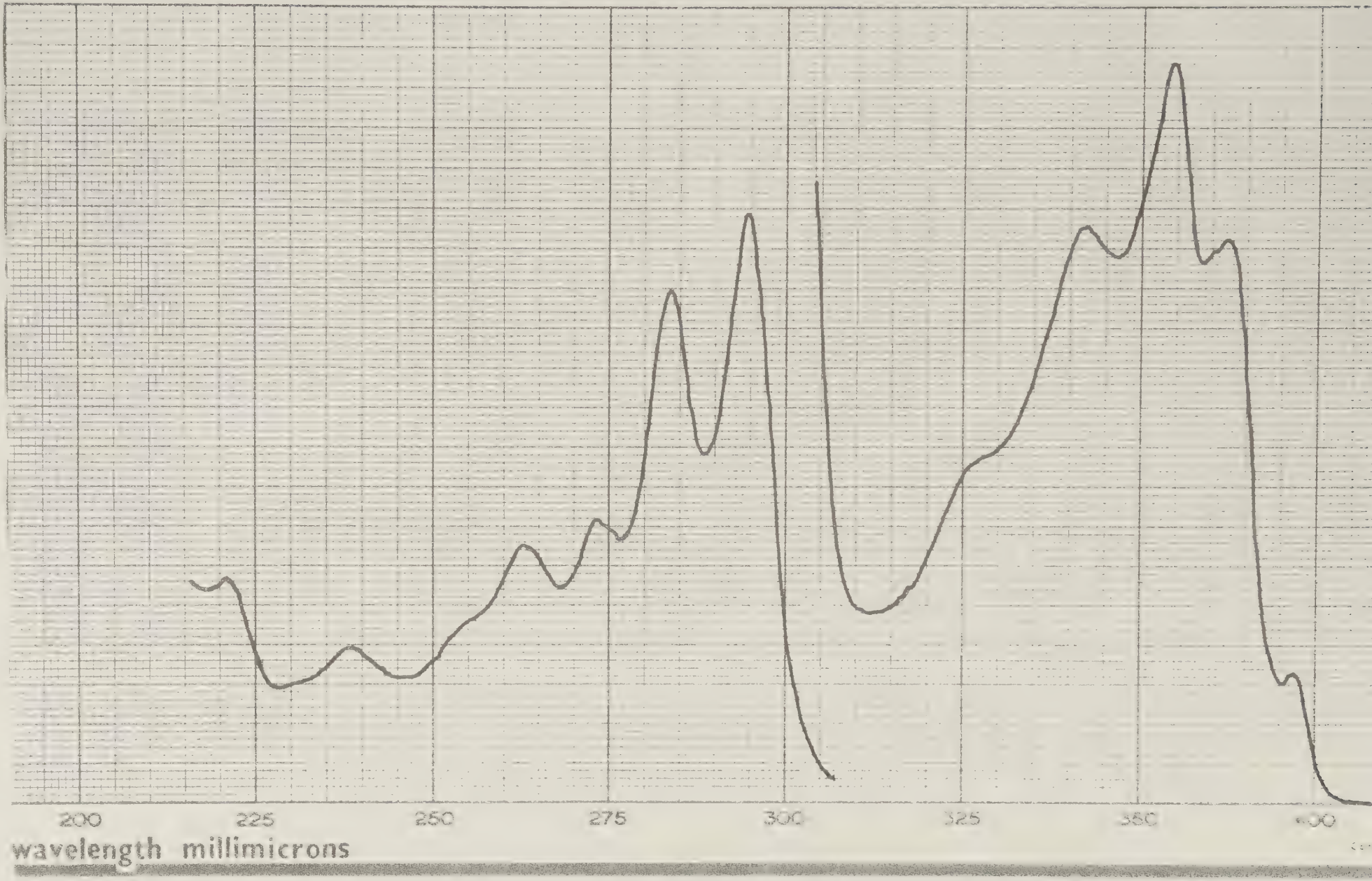


Fig. 17

Spectre d'absorption dans l'ultratiolet du 12-hydroxyméthyl-7-méthylbenz(a)anthracène (12-OHM-7-M
dans l'éthanol.

Fig. 18

Spectre d'absorption dans l'ultraviolet du 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène (5,6-diHOH-7,12-DMBA) dans l'éthanol.

Fig. 19

Spectre d'absorption dans l'ultraviolet du 8,9-dihydro-8,9-dihydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène (8,9-diHOH-7,12-DMBA) dans l'éthanol.

Fig. 20

Spectre d'absorption dans l'ultraviolet du 7,12-dihydroxyméthylbenz(a)anthracène (7,12-diOHM-BA) dans l'éthanol.

Fig. 21

Spectre d'absorption dans l'ultraviolet du 4-hydroxyméthyl-7,12-diméthylbenz(a)anthracène (4-OH-7,12-DMBA) dans l'éthanol.

Fig. 22 - PROPRIETES CHROMATOGRAPHIQUES DES PRINCIPAUX METABOLITES DU DMBA DANS LE SYSTEME DECRIT DANS LE TEXTE.

PRODUITS	Rf moyen.	Fraction dans laquelle le produit est obtenu.
7,12-DMBA	0,97	1
12-OHM-7-MBA	0,80	4
3-OH-7,12-DMBA	0,77-0,80	5 - 6
4-OH-7,12-DMBA	0,77-0,80	5 - 6
7-OHM-12-MBA	0,70	8
7,12-diOHM-BA	0,45	14
8,9-diHOH-7,12-DMBA	0,24	17

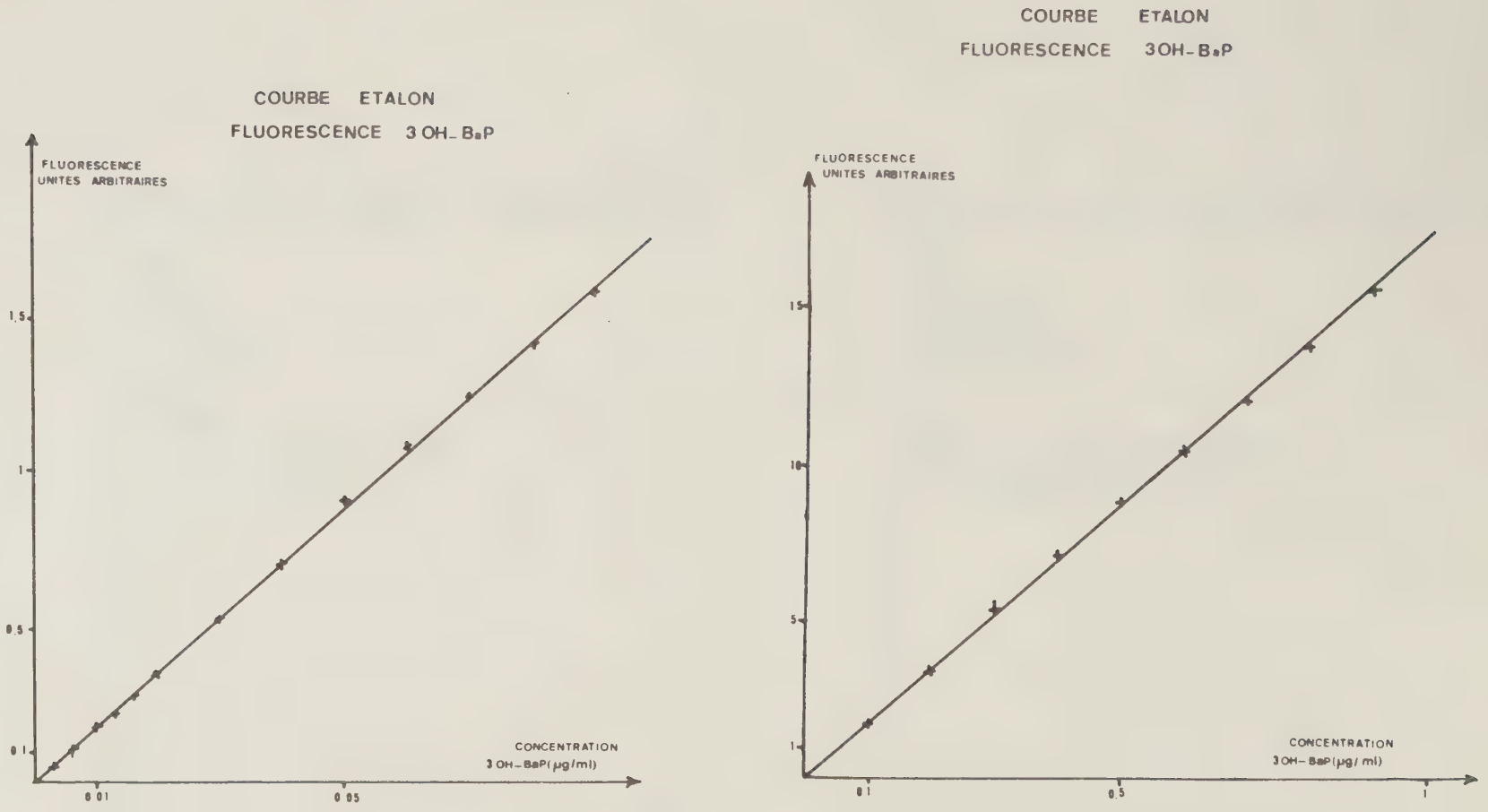
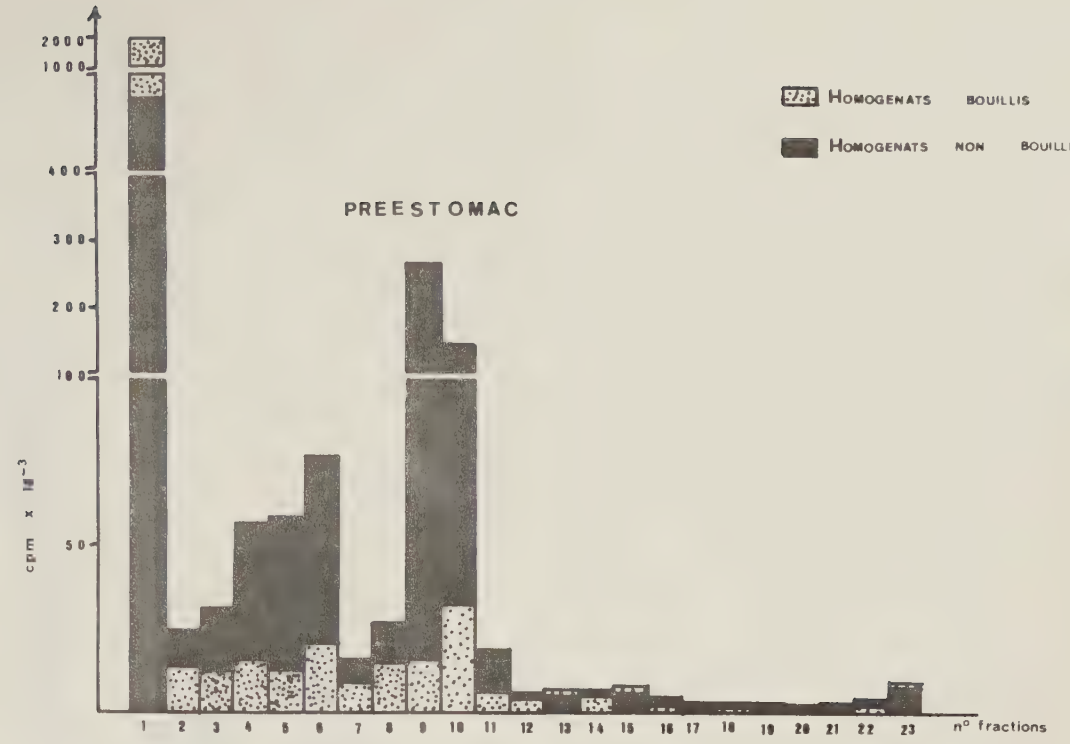


Fig. 23

Courbe étalon de fluorescence du 3-hydroxybenzo(a)pyrène



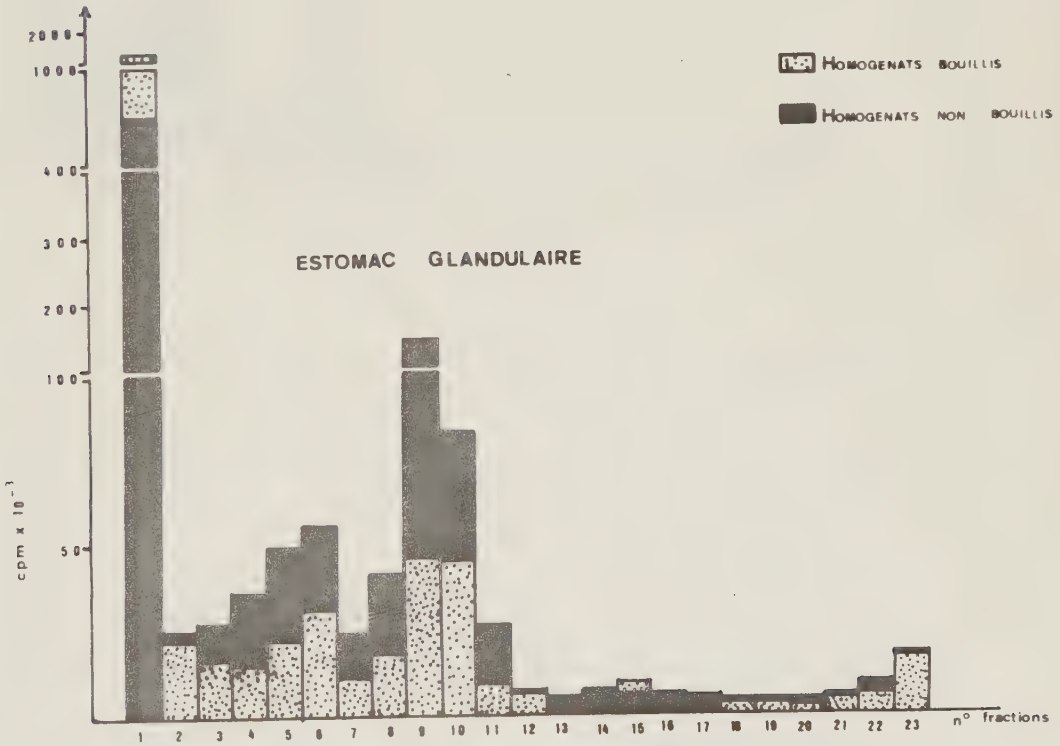


Fig. 24

Radioactivité des fractions obtenues par chromatographie des extraits des homogénats de préestomac et d'estomac glandulaire incubés 45 mn en présence de DMBA-^{3}H.

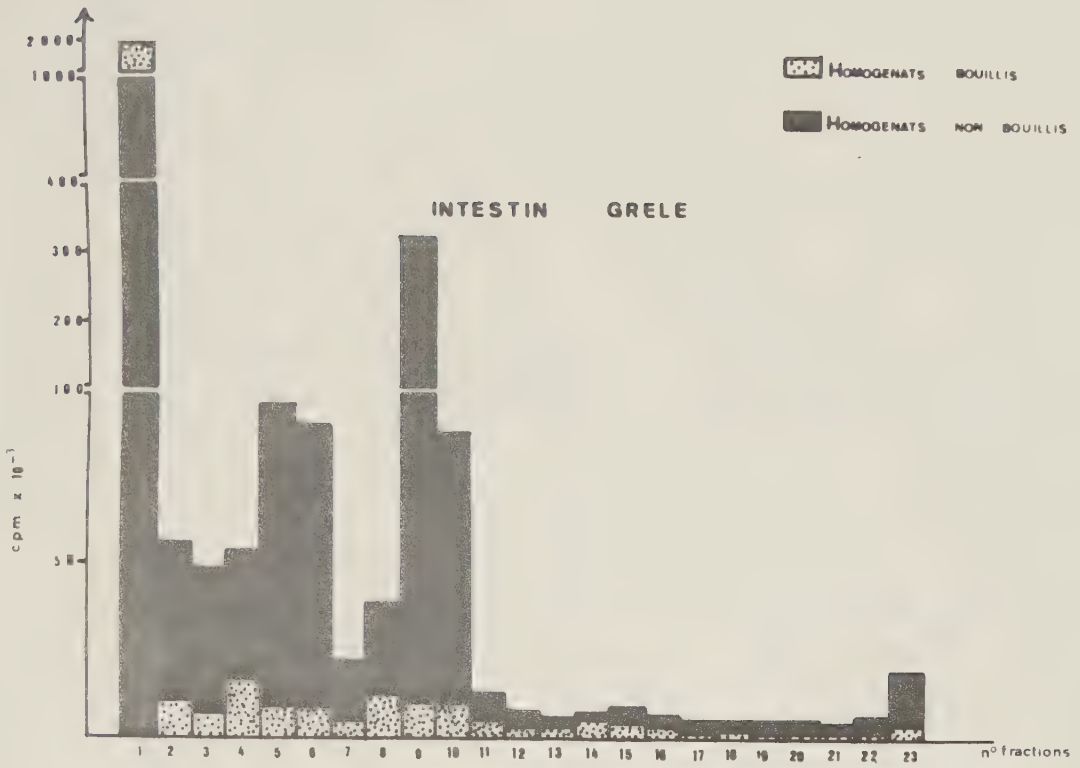


Fig. 25

Radioactivité des fractions obtenues par chromatographie des extraits des homogénats d'intestin grêle incubés 45 mn en présence de DMBA-^{3}H.

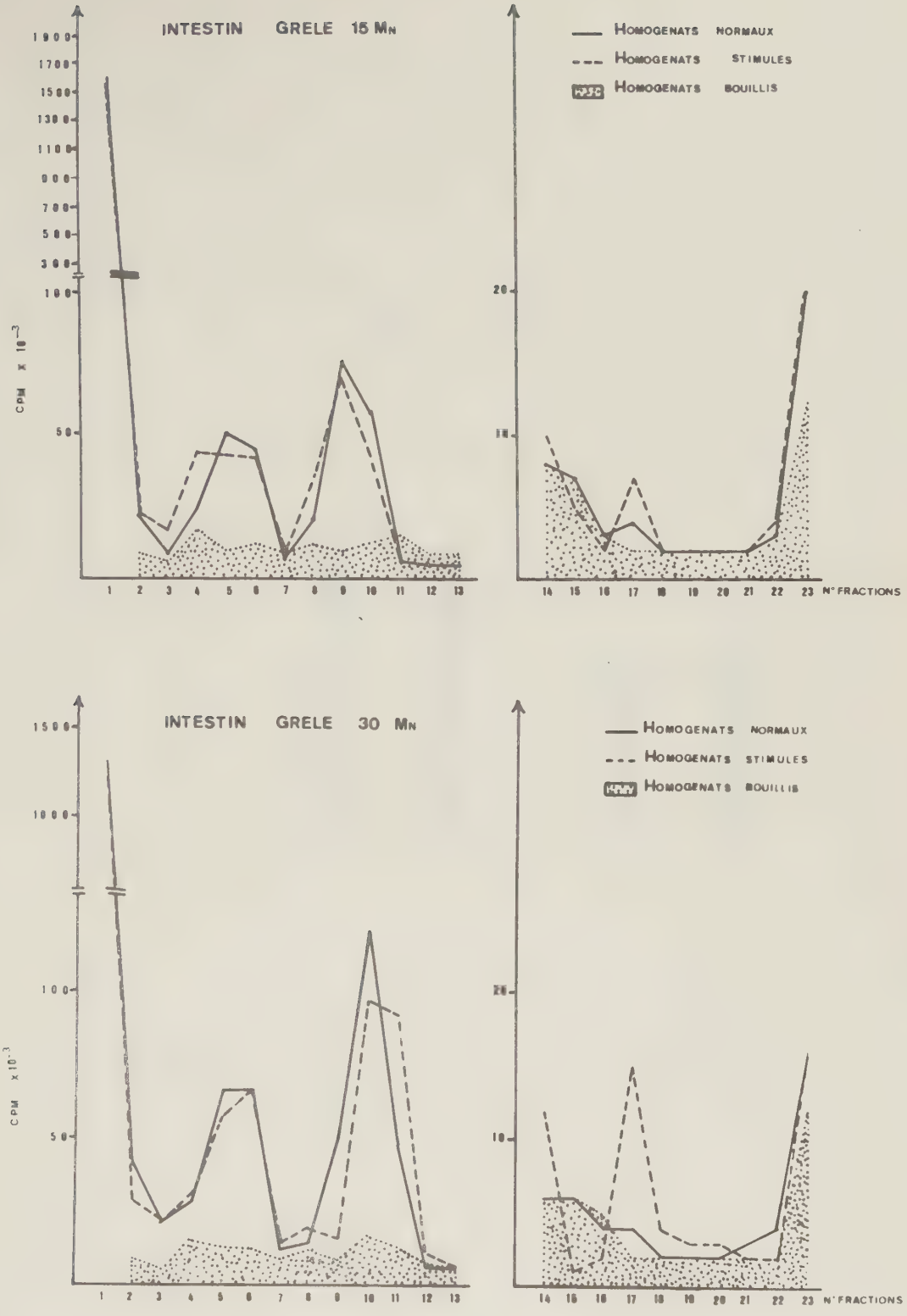


Fig. 26

Radioactivité des fractions obtenues par chromatographie des extraits des homogénats d'intestin grêle de souris normales ou prétraitées par le 3-méthylcholanthrène, incubés 15 ou 30 mn en présence de DMBA-^{3}H.

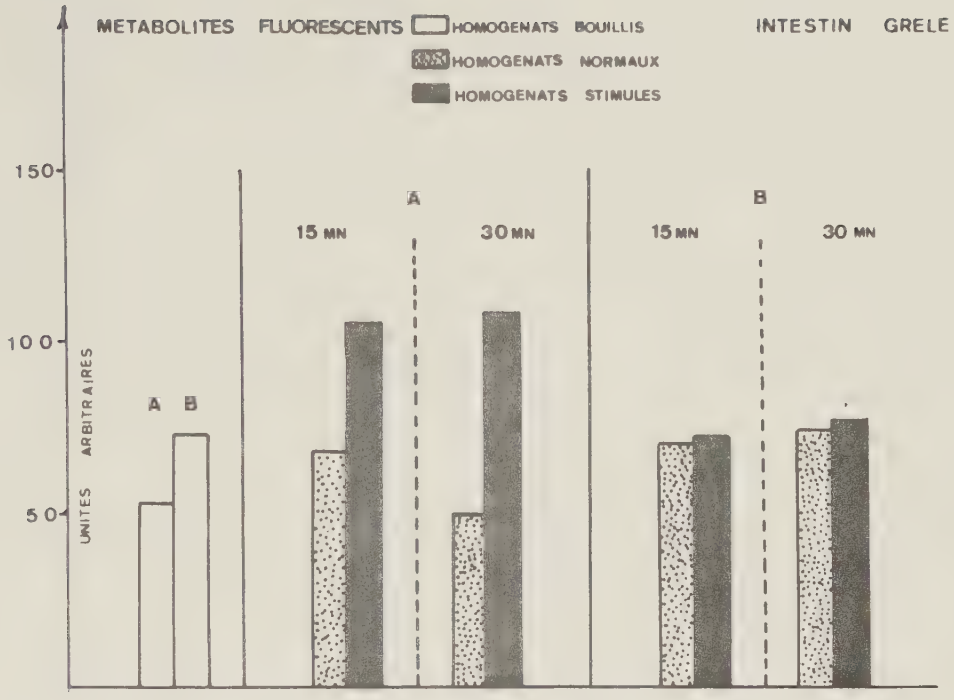


Fig. 27

Métabolites fluorescents A et B produits par des homogénats d'intestin grêle de souris normales ou prétraitées par le 3-méthylcholanthrène, incubés 15 ou 30 mn.

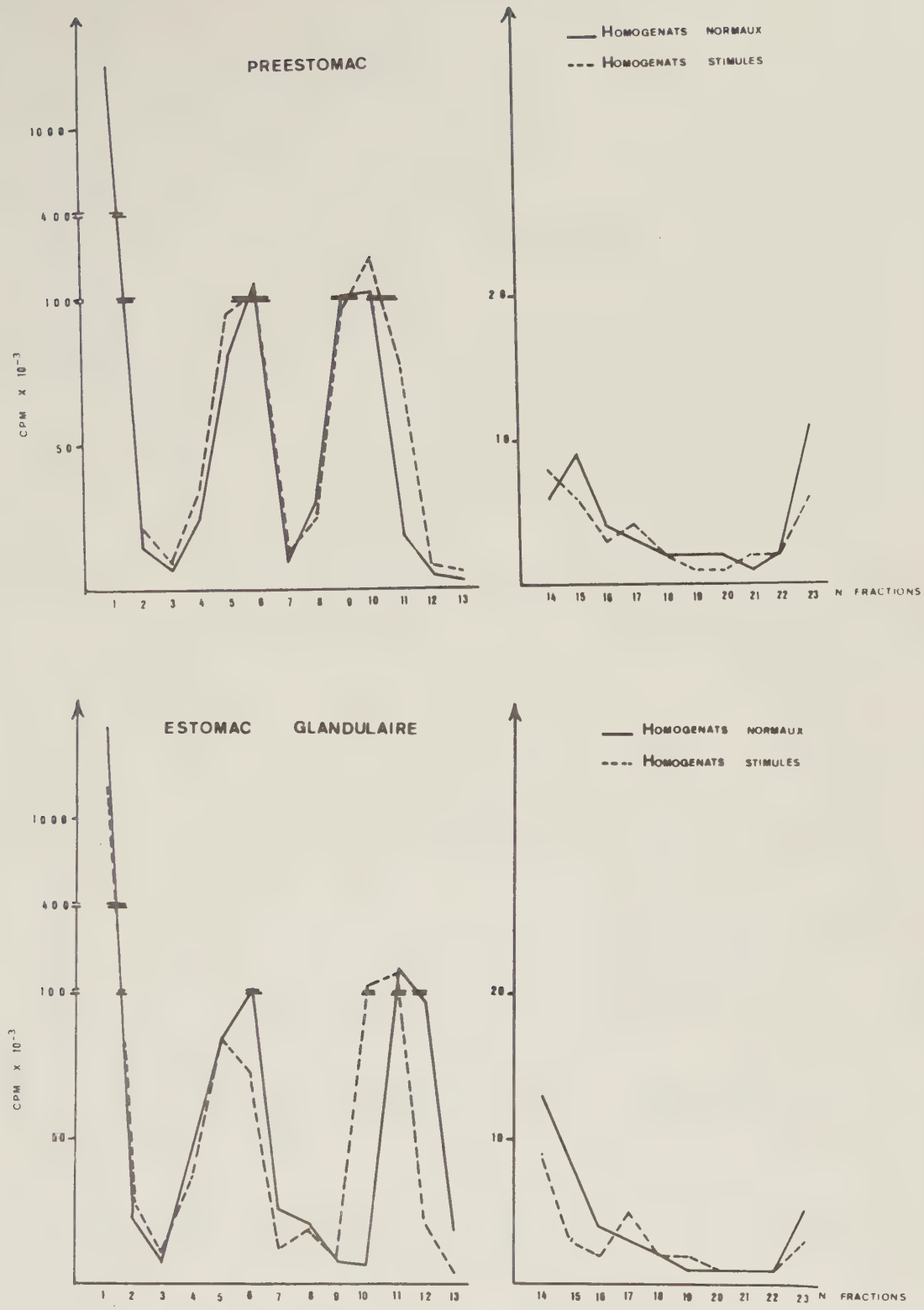


Fig. 28

Radioactivité des fractions obtenues par chromatographie des extraits des homogénats de préestomac et d'estomac glandulaire de souris normales ou prétraitées par le 3-méthylcholanthrène, incubés 30 mn, en présence de DMBA-^{3}H

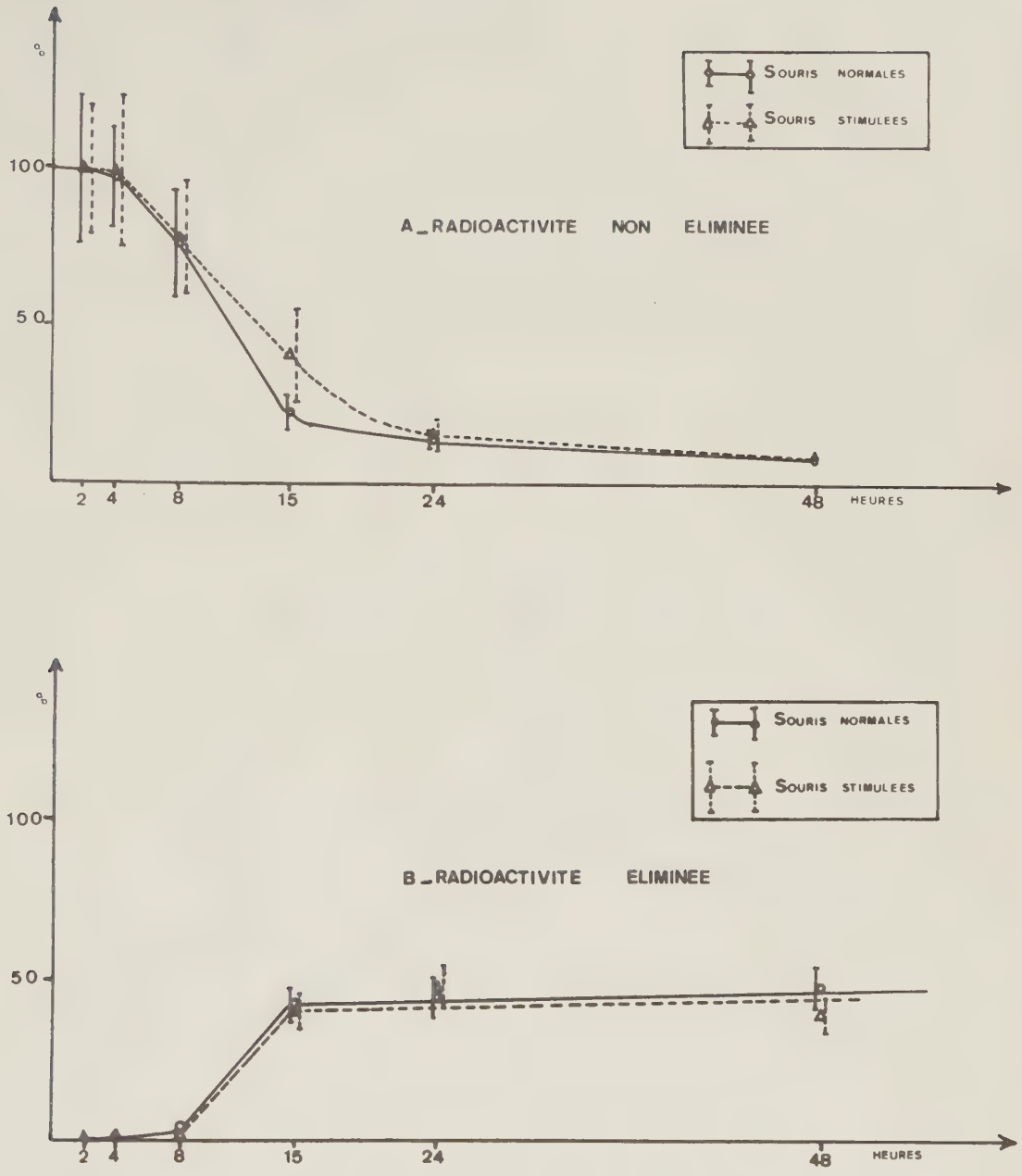


Fig. 29

Radioactivité (en % de la dose ingérée) non éliminée et éliminée par des souris normales ou prétraitées par le 3-méthylcholanthrène après ingestion orale de DMBA-^{3}H.

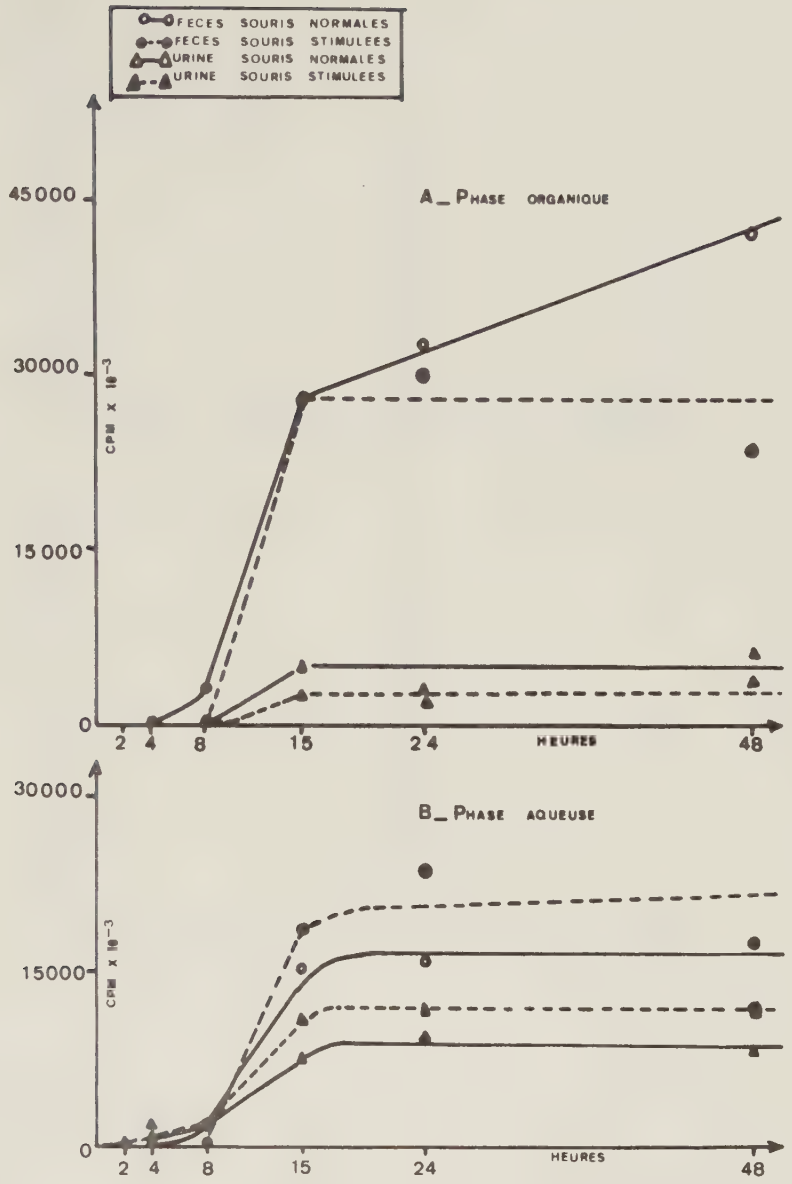


Fig. 30

Radioactivité des phases organiques et aqueuses des urines et fèces de souris normales ou prétraitées par le 3-méthylcholanthrène après administration orale de DMBA-^{3}H.

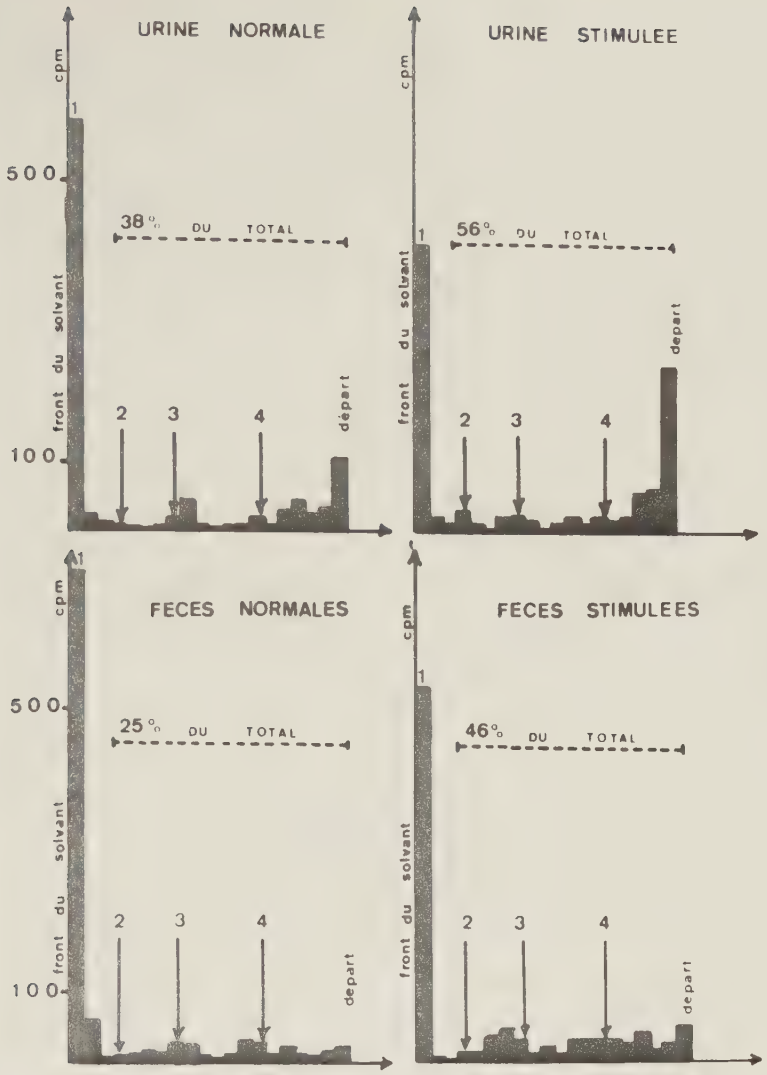


Fig. 31

Radioactivité (rapportée à 1000 cpm) des fractions obtenues par chromatographie des phases organiques des urines et des fèces de souris normales ou prétraitées par le 3-méthylcholanthrène, après administration orale de DMBA-^{3}H.

1 - DMBA

2 - 12-OHM-7-MBA

3 - 7-OHM-12-MBA

4 - 8,9-diHOH-7,12-DMBA

CONCLUSIONS GENERALES

La première partie de notre étude a porté sur les effets biologiques au niveau du tube digestif, d'un hydrocarbure polycyclique administré par voie orale : le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA). L'ingestion de la substance a été réalisée selon deux modes bien distincts. Le premier a consisté en une administration massive et unique de l'hydrocarbure dissous dans de l'huile d'olive, le second en une administration à faible dose et à long terme en l'incorporant dans le régime habituel des souris. Ingéré massivement le DMBA a conduit à la formation de papillomes du préestomac, la partie glandulaire de l'estomac étant indemne de toute lésion. A faible dose et à long terme le DMBA a déterminé également la production de papillomes gastriques, et, de plus, a induit des tumeurs "à distance" dans le mésentère. Histologiquement ces dernières tumeurs se sont révélées être des hémangio-endothéliomes malins, un syndrome hémorragique péritonéal provoquant la mort des animaux.

Dans la seconde partie de notre travail la fixation du DMBA par les différentes parties du tractus digestif a été étudiée. Le DMBA, uniformément tritié, a été administré oralement à des souris normales ou préalablement accoutumées à l'hydrocarbure par un régime en contenant de faibles quantités. Cette étude a montré que la fixation du DMBA était 10 à 15 fois supérieure dans le préestomac que dans l'estomac glandulaire. La radioactivité du mésentère des souris normales ou prétraitées est restée relativement faible. Une augmentation fugace de celle-ci a cependant été enregistrée chez les souris accoutumées. Par voie

.../...

intraveineuse le DMBA n'a pas révélé d'affinité particulière pour le préestomac, les différents segments du tube digestif ayant une radioactivité sensiblement identique entre eux. Par contre, celle du foie et des reins, particulièrement élevée, indiquait les voies principales d'élimination de l'hydrocarbure. Ces résultats ainsi que ceux d'une analyse autohistoradiographique ont conduit à penser que la pénétration du DMBA dans le préestomac (organe d'absorption) et sa non pénétration dans l'estomac glandulaire (organe sécréteur) étaient en accord étroit avec la physiologie de ces organes et pouvaient être impliquées dans l'induction de papillomes pour l'un et l'absence totale de lésion pour l'autre.

Nous avons essayé ensuite de mettre en évidence une fixation de l'hydrocarbure sur les constituants biochimiques des cellules. Après une administration par tubage gastrique de DMBA tritié, l'ADN, l'ARN et les protéines du préestomac, de l'estomac glandulaire et de l'intestin grêle ont été isolés . L'ADN, l'ARN et les protéines des trois organes ont montré une certaine radioactivité, le préestomac fixant toujours beaucoup plus d'hydrocarbure que les autres parties du tube digestif. Notons toutefois que des expériences similaires effectuées à titre de contrôle, ont montré une fixation très importante avec le benzanthracène, non cancérigène. Il est donc difficile de tirer des conclusions sur ce point.

Nos efforts ont ensuite porté sur le métabolisme du DMBA par le tube digestif d'animaux normaux et d'animaux dont

.../...

le métabolisme avait été stimulé par une instillation de 3-méthylcholanthrène. Cette étude a été conduite "in vitro" par la technique d'incubation d'homogénats de tissu, et "in vivo".

"In vitro", les études ont mis en évidence que des homogénats de préestomac, d'estomac glandulaire et d'intestin grêle métabolisaient le DMBA de même que des homogénats de foie.

Les principaux dérivés obtenus ont été : le 7-hydroxyméthyl-12-méthylbenz(a)anthracène et le 12-hydroxyméthyl-7-méthylbenz(a)anthracène. Des phénols : les 3 et 4-hydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène ont probablement été formés; par contre, les dérivés très polaires attendus et formés par le foie de rat n'ont pas ou peu été produits. La stimulation par le 3-méthylcholanthrène s'est révélée totalement inefficace sur le métabolisme du DMBA par les homogénats des deux parties de l'estomac. Par contre elle a modifié de façon notable celui des homogénats d'intestin grêle en entrainant la production d'un autre métabolite le 8,9-dihydro-8,9-dihydroxy-7,12-diméthylbenz(a)anthracène, identifié comme tel par comparaison avec le 8,9-dihydro-8,9-dihydroxybenz(a)anthracène, sa synthèse n'ayant pu être réalisée. Ce 8,9-dihydrodiol n'a pratiquement pas été produit par l'intestin grêle de souris normales, mais il l'a été par les homogénats de foie de ces mêmes souris. D'autre part, et ceci semble particulièrement intéressant, la stimulation a entrainé la production d'un métabolite fluorescent inconnu, A, décrit par LEVIN et CONNEY. Il a été déduit, compte tenu des

.../...

conditions expérimentales, que ce métabolite A pouvait être le 8,9-dihydrodiol.

A titre de contrôle, l'influence du prétraitement des animaux par le 3-méthylcholanthrène sur le métabolisme du DMBA a été comparée à celle sur le métabolisme du benzo(a)pyrène. Le prétraitement a été plus conséquent sur la transformation du benzo(a)pyrène que sur celle du DMBA, le métabolite testé (le 3-hydroxy-benzo(a)pyrène) étant augmenté d'une façon très nette.

"In vivo", l'étude des voies d'élimination du DMBA a mis en évidence que l'excrétion de celui-ci se faisait par les urines et surtout par les fèces. Il a été éliminé sous forme d'hydrocarbure inchangé et de métabolites solubles dans l'eau ou les solvants organiques. Dans les fèces, les métabolites solubles dans l'acétate d'éthyle ont été les plus abondants, alors que dans les urines se sont les métabolites solubles dans l'eau.

L'analyse chromatographique de la radioactivité extraite par l'acétate d'éthyle a mis en évidence un mélange de métabolites sans prépondérance bien marquée dans les fèces, et la présence de produits polaires, probablement des acides carboxyliques, dans les urines. La stimulation par le 3-méthylcholanthrène a augmenté la production de ces métabolites tant dans les fèces (46 % contre 25 %) que dans les urines (56 % contre 38 %).

.../...

La conversion du DMBA en produits solubles dans l'eau a également été augmentée. Cette augmentation est probablement liée à une élévation de l'excrétion de l'hydrocarbure sous forme conjuguée.

Les principaux métabolites décrits ont été recherchés dans les différents segments du tube digestif, du foie et du mésentère. Un certain pourcentage en a été détecté dans les organes qui "in vitro" métabolisaient le DMBA, mais pas dans le mésentère. D'autre part l'absence d'accumulation d'un ou de plusieurs métabolites a conduit à penser que ceux-ci s'étaient formés "in situ" et étaient ensuite directement éliminés, sans être redistribués dans tout l'organisme par les voies sanguine ou lymphatique. Le prétraitement par le 3-méthylcholanthrène n'a pas modifié de façon importante ces données, seul le 8,9-dihydrodiol a été plus abondant dans le foie et l'intestin grêle.

Tout au long de ce mémoire des corrélations ont été recherchées entre la fixation, le devenir du DMBA au niveau du tractus digestif, la physiologie de ce dernier et les effets biologiques de l'hydrocarbure administré oralement. Bien que des relations étroites entre ces différents facteurs aient pu être établies, et que, dans l'état actuel de nos recherches, le DMBA

.../...

inchangé doive être considéré comme responsable des lésions observées, le problème général du mode d'action des hydrocarbures au niveau de la cellule pouvant conduire à une transformation maligne, n'en reste pas moins posé.

BIBLIOGRAPHIE

L.J. ALFRED, H.V. GELBOIN

Benzpyrene hydroxylase induction by polycyclic hydrocarbons in hamster embryonic cells grown in vitro.

Science, 157, 75-76, (1967).

L.J. ALFRED, P.J. DONOVAN, M.S. BAKER and J.A. Di PAOLO

Protection of cultured hamster embryonic cells from 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene citotoxicity and the induced synthesis of arylhydroxylase.

Cancer Res., 29, 1805-1809 (1969).

H.B. ANDERVONT and H.G. GRADY

Induction of hepatic lesions, hepatomas, pulmonary tumours and hemangioendotheliomas in mice with O-amino-azo-toluene.

J. Nat. Cancer Inst., 3, 131-153 (1942).

J.C. ARCOS, A.H. CONNEY and N.P. BUU-HOI

Induction of microsomal enzyme synthesis by polycyclic aromatic hydrocarbons of different molecular sizes.

J. Biol. Chem., 236, 1291-1296 (1961).

W.E. BACHMANN and J.J. BRADBURY

J. Org. Chem., 2, 175 (1938).

.../...

W.E. BACHMANN, E.L. KENNAWAY and N.M. KENNAWAY

The rapid production of tumors by two new hydrocarbons.

Yale J. Biol., and Med., 11, 97-102 (1938).

W.H. BAUER and J.J. BYRNE

Induced tumors of the parotid gland.

Cancer Res., 10, 755-761 (1950).

I. BERENBLUM

Significance of cocarcinogenic action and related phenomena.

Cancer Res., 1, 807-814 (1941).

I. BERENBLUM

9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene as a highly potent carcinogen for the rabbit skin.

Cancer Res., 5, 265-268 (1945).

I. BERENBLUM and P. SHUBIK

The role of croton oil applications, associated with a single painting of a carcinogen, in tumor induction of the mouse's skin.

Brit. J. Cancer, 1, 379-382 (1947).

I. BERENBLUM and P. SHUBIK

An experimental study of the initiating stade of carcinogenesis, and a re-examination of the somatic cell mutation theory of cancer.

Brit. J. Cancer, 3, 109-118 (1949).

.../...

I. BERENBLUM and N. HARAN

The influence of dose of carcinogen, emptiness of stomach and other factors on tumor induction in the forestomach of the mouse.

Cancer Res., 15, 504-509 (1955 a).

I. BERENBLUM and N. HARAN

The influence of croton oil and polyethylene glycol-400 on carcinogenesis in the forestomac of the mouse.

Cancer Res., 15, 510-516 (1955 b).

F.G. BOCK

Early effects of hydrocarbons on mammalian skin.

Progres. Exp. Tumour Res., (Karger Ed).

New-York, 4, 126-128 (1964).

F.G. BOCK and T.L. DAO

Factors affecting the polynuclear hydrocarbon level in rat mammary glands.

Cancer Res., 21, 1024-1029 (1961).

E. BOYLAND

YALE J. Biol. and Med., 1948, 20, 321

(Cité par A. PULLMAN et B. PULLMAN).

E. BOYLAND

Ann. Rev. Biochem., 1949, 217

(Cité par A. PULLMAN et B. PULLMAN).

.../...

E. BOYLAND

J. de Chimie Phys., 1950, 47, 942

(Cité par A. PULLMAN et B. PULLMAN).

E. BOYLAND and P. SIMS

Metabolism of polycyclic compounds : 20. The metabolism of phenanthrene in rabbits and rats : mercapturic acids and related compounds.

Biochem. J., 84, 564-570 (1962 b).

E. BOYLAND and P. SIMS

Metabolism of polycyclic compounds : 21. The metabolism of phenanthrene in rabbits and rats : dihydrodihydroxycompounds and related glucosiduric acids.

Biochem. J., 84, 571-581 (1962 a).

E. BOYLAND and P. SIMS

Metabolism of polycyclic compounds : the metabolism of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene by rat liver homogenates.

Biochem. J., 95, 780-787 (1965).

E. BOYLAND, P. SIMS and C. HUGGINS

Induction of adrenal damage and cancer with metabolites of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.

Nature, 207, 816-817 (1965).

E.BOYLAND and P. SIMS

The effect of pretreatment with adrenal protecting compounds on the metabolism of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and related compounds by rat liver homogenates.

Biochem. J., 104, 394-403 (1967).

P. BROOKES and P.D. LAWLEY

Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin : relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid.

Nature, 202, 781-784 (1964).

W.R. BRYAN and M.B. SHIMKIN

Quantitative analysis of dose response data obtained with three carcinogenic hydrocarbons in strain C3H male mice.

J. Nat. Cancer Inst., 3, 303-331 (1943).

G. CALCUTT and S. PAYNE

The intracellular distribution of 3,4 benzpyrene during metabolism in the mouse liver

Brit. J. of Cancer, 7, 279-282 (1953).

Cora P. CHERRY and A. GLUCKMANN

The histogenesis of carcinomas and sarcomas induced in the salivary glands of rats.

Brit. J. Cancer, 19, 787-801 (1967).

I. CHOUROULINKOV, M.R. RIVIERE et M. GUERIN

Action carcinogène et influence métastatique du méthylcholanthrène chez la souris à des doses et concentrations diverses.

Bull. Cancer, 43, 377-384 (1961).

.../...

N.H. COLBURN and R.K. BOUTWELL

The in vivo binding of β propiolactone to mouse skin DNA, RNA and proteins.

Cancer Res., 28, 642-652 (1968).

A.H. CONNEY, E.C. MILLER and J.A. MILLER

The metabolism of methylated aminoazo dyes V : Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene.

Cancer Res., 16, 450-459 (1956).

A.H. CONNEY, J.R. GILETTE, J.K. INSCOE, E.R. TRAMS and H.S. POSNER

Induced synthesis of liver microsomal enzymes which metabolize foreign compounds.

Science, 130, 1478-1479 (1959).

A.H. CONNEY and W. LEVIN

Induction of hepatic 7,12-dimethylbenz(a)anthracene metabolism by polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic azo derivatives.

Life Science, 5, 465-471 (1966).

J.W. COOK and R. SHOENTAL

J. Chem. Soc., 170, (1948).

A.R. CURRIE, C.C. BIRD, A.M. CRAWFORD and P. SIMS

Embryopathic effects of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and its hydroxymethylderivatives in the sprague-Dawley rat.

Nature Lond., 226, 911-914 (1970).

P.M. DANIEL and M.M.L. PRICHARD

Three types of mammary tumour induced in rats by feeding with D.M.B.A.

Brit. J. Cancer, 18, 513-520 (1967).

P.M. DANIEL and O.E. PRATT

Metabolism of labelled carcinogenic hydrocarbons in rats.

Nature, 215, 1142-1146 (1967).

T.L. DAO, F.G. BOCKAND and S. CROUCH

Level of 3-methylcholanthrene in mammary glands of rats after intragastric instillation of carcinogen.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 102, 635-638 (1959).

T.L. DAO and Y. TANAKA

Inhibitory effect of 3-methylcholanthrene in induction of massive necrosis of adrenal cortex by 7,12-dimethylbenz(a) anthracene.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 113, 78-81 (1963 a).

T.L. DAO and Y. TANAKA

Inhibitory effect of polynuclear hydrocarbons and amphenon analogues on induction of acute adrenal necrosis by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.

Cancer Res., 23, 1148-1152 (1963 b).

T.L. DAO and H. YOGO

Effects of polynuclear aromatic hydrocarbons on benzpyrene hydroxylase activity in rats.

Proc. Soc . Exp. Biol. Med., 116, 1048-1050 (1964).

.../...

T.L. DAO and R.M. VARELLA

On the mechanism of inducing protection of the adrenal cortex against injury from 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. Effect of inducers on benzpyrene hydroxylase activity.
Cancer Res., 26, 1015-1021 (1966).

G. DELLA PORTA, L. KOLB and P. SHUBIK

Induction of tracheobronchial carcinomas in the syrian golden hamster.
Cancer Res., 18, 592-596 (1958).

P.A. DELWAIDE

Etudes sur l'action biologique du benz(a)pyrène III. Localisation du benz(a)pyrène tritié chez le rat après administration intrapéritonéale.
Biochem. Pharm., 18, 1275-1283 (1969).

L. DIAMOND, V. DEFENDI and P. BROOKES

The interaction of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene with cells sensitive and resistant to toxicity induced by this carcinogen;
Cancer Res., 27, 1, 890-897 (1967).

L. DIAMOND, C. SARDET and G.H. ROTHBLAT

The metabolism of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in cell cultures.
Int. J. Cancer, 3, 838-849 (1968).

.../...

DICKENS

Brit. Emp. Cancer Comp. 22nd Rep. 1945, 55

DOMSKY, W. LIJINSKY, K. SPENCER and P. SHUBIK

Rate of metabolism of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene in new born and adult mice.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 113, 110-113 (1963).

M.DUNCAN, P. BROOKES and A. DIPPLE

Metabolism and binding to cellular macromolecules of a serie of hydrocarbons by mouse embryo cells in culture.

Int. J. Cancer, 4, 813-819 (1969).

J.H. EDCOMB and H. MITCHELIS

Cutaneous melanomas of guinea pig following repeated applications of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.

Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 3, 222 (1961).

P. EKWALL, P. ERMALA, K. SETALA

Gastric absorption of 3,4-benzpyrene II the significance of the solvant for the penetration of 3,4 benzpyrene into the stomach wall.

Cancer Res., 12, 758-763 (1952).

J. ENGELBRETH-HOLM and H. LEFEVRE

Acceleration of development of leukemias and mammary carcinomas in mice by 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene.

Cancer Res., 1, 102-108 (1941).

.../...

J. ENGELBRETH-HOLM and R. RASK-NIELSEN

On the sensitivity of different tissues in street strain mice to 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene.

Cancer Res., 27, 129-133 (1947).

J. ENGELBRETH-HOLM and S. IVERSEN

On the mechanism of experimental carcinogenesis II - The effect of different concentration of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene on skin carcinogenesis in mice.

Acta Path. XXIX, 1, 77-83 (1951).

J. ENGELBRETH-HOLM and Em. JENSEN

On the mechanism of experimental carcinogenesis. The influence of age and of growth hormon on skin carcinogenesis in mice.

Acta Path. et Microb. Scand., XXXIII, 3, 257-261 (1953).

P. ERMALA, K. SETALA and P. EKWALL

Gastric absorption of 3,4-benzopyrene I - The effect of physiological processes on absorption.

Cancer Res., 11, 753-757 (1951).

H.L. FALK

Metabolism of benzo(a)pyrene in rats with and without liver injury.

Acta Unio. Int. Contra Cancrum, 19, 528-530 (1963).

H.L. FALK, P. KOTIN, S.S. LEE and A. NATHAN

Intermediary metabolism of benzo(a)pyrene in the rat.

J. Nat. Cancer Inst., 28, 3, 699-724 (1962).

.../...

J.W. FLESHER

Distribution of radioactivity in the tissues of rats after oral administration of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-^{3}H.
Biochem. Pharmac., 16, 1821-1831 (1967).

J.W. FLESHER and K.L. SYDNOR

Distribution and excretion of radioactivity in rats after oral administration of ^{3}H-3-methylcholanthrene.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 104, 776-779 (1960).

E. FORD and C. HUGGINS

Selective destruction in testis induced by 7,12-dimethylbenz(a) anthracene.
J. Exp. Med., 118, 27-40 (1943).

R.L. FURNER, T.E. GRAM and R.E. STITZEL

The influence of age, sex and drug treatment on microsomal drugmetabolism in four rat strains.
Biochem. Pharm., 18, 1635-1641 (1969).

E.B. GAMMAL, K.K. CARROLL, B.H. MUHLSTOCK and E.R. PLUNKETT

Quantitative estimation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in rat mammary tissue by gas liquid chromatochraphy.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119, 1086-1089 (1965).

H.V. GELBOIN

A microsome-dependant binding of benz(a)pyrene to DNA.
Cancer Res., 1272-1276 (1969).

.../...

H.V. GELBOIN

Advance in Cancer Res., 10, 1-76 (1970).

H.V. GELBOIN and N.R. BLACKBURN

The stimulatory effect of 3-methylcholanthrene on microsomal aminoacid incorporation and benzpyrene hydroxylase activity and its inhibition by actinomycin D.

Biochem. Biophysica Acta, 72, 657-660 (1963).

H.V. GELBOIN and N.R. BLACKBURN

The stimulatory effect of 3-methylcholanthrene on benzpyrene hydroxylase activity in several rat tissues : inhibition by actonomycin D and puromycin.

Cancer Res., 24, 256-260 (1964).

P.L. GROVER and P. SIMS

Enzyme-catalysed reactions of polycyclic hydrocarbons with deoxyribonucleic acid and protein in vitro.

Biochem., 110, 159 (1968).

P.L. GROVER and P. SIMS

Interactions of the K-region epoxides of phenanthrene and dibenz(a,h)anthracene with nucleic acids and histones.

Biochem. Pharmac., 19, 2251-2259 (1970).

P.L. GROVER, P. SIMS, E. HUBERMAN, H. MARQUARDT, T. KUROKI and C. HEIDELBERGER

In vitro transformation of rodent cells by K-region derivatives of polycyclic hydrocarbons.

Proc. Nat. Acad. Sciences N.Y. sous presse (1971).

J.C. GUILLON, A. GENTIL, C. LASNE et I. CHOUROULINKOV

Influence de la cohabitation sur la cancérogénèse mammaire par le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène chez la ratte.

C. R. Acad, Sc. Paris 270, 1066-1068 (1970).

H.I. HADLER and K. LEE

Distribution of radioactivity after intravenous administration of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene into the mouse.

J. Nat. Cancer Inst., 25, 697-701 (1960).

C. HEIDELBERGER and H.B. JONES

The distribution of radioactivity in the mouse following administration of dibenzanthracene labelled in the 9 and 10 positions with carbon 14.

Cancer, 1, 252-260 (1948).

C. HEIDELBERGER and S. Marguerite WEISS

The distribution of radioactivity in mice following administration of 3,4-benzpyrene-5-C^{14} and 1,2,5,6-dibenzanthracene-9,10-C^{14}.

Cancer Res., 11, 885-891 (1951).

H. HENNINGS, G.T. BOWDEN and R.K. BOUTWELL

The effect of croton oil pretreatment on skin tumor initiation in mice.

Cancer Res., 29, 1773-1780 (1969).

.../...

J.S. HOWELL

Intranasal administration of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene to rats : the development of breast and lung tumors.

Brit. J. of Cancer, 15, 263-269 (1961).

J.S. HOWELL, June MARCHANT and J.W. ORR

The induction of ovarian tumors in mice with 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene.

Brit. J. Cancer, 8, 635 (1954).

E.L. HOWES and J.R. de OLIVIERA

Early changes in the experimentally produced adenomas and adenocarcinomas of the stomach.

Cancer Res., 8, 419-428 (1948).

C. HUGGINS and S. MORII

Selective adrenal necrosis and apoplexy induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.

J. Exp. Med., 114, 741-760 (1961)

C. HUGGINS, L.C. GRAND and F.P. BRILLANTES

Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons and its suppression.

Nature, 189, 204-207 (1961).

C. HUGGINS and R. FUKUNISHI

Mammary and peritoneal tumors induced by intraperitoneal admitration of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in newborn and adult rats.

Cancer Res., 23, 785-789 (1963).

.../...

C. HUGGINS, T.F. DEVEL and R. FUKUNISHI

Protection of adrenal cortex by hydrocarbons against injury from 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.

Biochem., Z., 338, 106-113 (1963).

C. HUGGINS and J. PATAKI

Aromatic azo derivatives preventing mammary cancer and adrenal injury from 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 53, 791-796 (1965).

C. HUGGINS and L. GRAND

Neoplasm evoked in male sprague Dawley rat by pulse doses of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.

Cancer Res., 26, 2255-2258 (1966).

C.B. HUGGINS and T. SUGIYAMA

Induction of leukemia in rat by pulse doses of 7,12-dimethyl-benz(a)anthracene.

Proc. Nat. Acad. Sciences USA, 55, 74-81 (1966).

J. IBALL

The relative potency of carcinogenic compounds.

Am. J. Cancer, 35, 188-190 (1939).

L.I.A. IBLONOVSKAIA

Cerebral tumors in mice induced with 9,10-dimethyl-1,2-benzan-thracene.

[illegible], 1128-1134 (1960).

.../...

D.H. JANSS and R.C. MOON

Uptake and clearance of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene-9-^{14}C by mammary parenchymal cells of the rat.

Cancer Res., 30, 473-478 (1970).

P.H. JELLINCK and B. GOUDY

Protective action of polycyclic hydrocarbons against induction of adrenal necrosis by dimethylbenzanthracene.

Science, 152, 1375-1376 (1966).

P.H. JELLINCK and G. SMITH

Metabolism of 7-hydroxymethyl-12-methylbenz(a)anthracene 12-^{14}C in vitro.

Biochem. Pharm., 18, 680-682 (1969).

J.W. JULL, D.J. STREETER and L. SUTHERLAND

The mechanism of induction of ovarian tumors in the mouse by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. Effect of steroid hormones and carcinogen concentration in vivo.

J. Nat. Cancer Inst., 37, 409-420 (1966).

R.F. KEELER

Color reaction for certain amino-acids, amines and proteins.

Science, 129, 1617-1618 (1959).

M. KLEIN

Induction of skin tumors in the mouse with minutes doses of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene alone or with croton oil.

Cancer Res., 16, 123-127 (1956).

.../...

P. KOTIN, H.L. FALK and R. BUSSER

Distribution, retention and elimination of C^{14}-3,4-benzpyrene after administration to mice and rats.

J. Nat. Cancer Inst., 23, 541-555 (1959).

M. KURATSUNE, Y. MASUDO and K. MORI

Polycyclic aromatic hydrocarbons in Japanese smoked fishes. (Ninth international cancer Congress-1966).

Y. KURITA, T. SUGIYAMA and Y. NISHIZUKA

Cytogenetic studies on rat leukemia induced by pulse dose of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.

Cancer Res., 28, 1738-1752 (1968).

L.W. LAW

The induction of leukemias in mice following percutaneous application of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene.

Cancer Res., 1, 564-571 (1941).

W. LEVIN and A.H. CONNEY

Stimulatory effect of polycyclic hydrocarbons and aromatic azo derivatives on the metabolism of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene.

Cancer Res., 27, 1931-1938 (1967).

F. LINELL and J.G. NORDEN

Studies of the action of carcinogenic hydrocarbons on the skin of the rabbit.

.../...

The tumor producing effect a comparaison between 3,4-benzpyrene and 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene and between different areas of the skin.

Acta Path. XXVII, 3, 394-413 (1950).

E. LORENZ and H.L. STEWART

Tumour of the alimentary tract induced in mice by feeding olive oil emulsions containing carcinogenic hydrocarbons.

J. Nat. Cancer Inst., 7, 227-238 (1947).

E. LORENZ and H.L. STEWART

Tumour of alimentary tract in mice fed carcinogenic hydrocarbons in mineral oil emulsions.

J. Nat. Cancer Inst., 9, 173-180 (1948).

LO SIN MAO

Distribution of labelled DMBA in rat tissues and organs and its excretion from the body.

Fed. Proc. (Trans. Supp.) 24, 4, 699-701 (1965).

June MARCHANT

The effect of hypophysectomy on the development of ovarian tumors in mice treated with dimethylbenzanthracene.

Brit. J. Cancer, 15, 821-827 (1961).

June MARCHANT

Development of adrenal cortical carcinoma in C_3H mice following castration and the administration of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.

Brit. J. Cancer, 21, 750-754 (1967).

J. MARCHANT, J.W. ORR and D.C. WOODHOUSE

Induction of ovarian tumors with 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene.

Nature, 173, 307 (1954).

R. MONIER, S. NIONO, D. HAYES, F. HAYES, and F. GROS

Studies on the heterogeneity of messenger RNA from E. Coli.

J. Mol. Biol., 5, 311-324 (1962).

T.C. Mc. MULLEN

J. Am. Chem. Soc., 44, 2055 (1922).

D.W. NERBERT and A.H. GELBOIN

The in vivo and in vitro induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cells in different species, tissues, strains and développmental and hormonal states.

Arch. Biochem. Biophys., 134, 76-89 (1969).

Ch. OBERLING

Le Cancer

Gallimard Ed. 1954.

F. OESCH and J. DALY

Solubilization, purification and properties of a hepatic epoxide hydrase.

Biochem. et Biophys. Acta, 227, 692-697 (1971).

H. PANDOV and P. SIMS

The conversion of phenanthrene 9,10-oxide and dibenz(a,h)anthracène, 5,6-oxide into dihydrodiols by a rat liver microsomal enzyme.

.../...

Biochem. Pharmac., 19, 299 (1970).

A. PULLMAN et B. PULLMAN

Cancérisation par les substances chimiques et structure moléculaire.

Masson et Cie. Editeurs.

H. RAPPAPORT and C. BARONI

A study of the pathogenesis of malignant lymphome induced in the swiss mouse by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene injected at birth.

Cancer Res., 22, 1067-1074 (1962).

R. RASK-NIELSEN

Investigations into the varying manifestation of leukaemic lesions following injection of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene into different subcutaneous sites in street mice.

Brit. J. of Cancer III, 549-556 (1949).

R. RASK-NIELSEN

On the susceptibility of the thymus, lung, subcutaneous and mammary tissues in strain street mice to direct application of small doses of four different carcinogenic hydrocarbons.

Brit. J. of Cancer, 4, 108-116 (1950 a).

R. RASK-NIELSEN

Types of tumours in the lungs of strain street mice following direct application of large doses of four different carcinogenic hydrocarbons.

Brit. J. of Cancer, 4, 117-123 (1950 b).

.../...

R. RASK-NIELSEN

Local and remote tumors in strain street mice following subcutaneous injection of large doses of four different carcinogenic hydrocarbons.

Brit. J. of Cancer, 4, 124-132 (1950 c).

GRAND RHODA

Cancer induction in the glandular stomach of rats at sites of implanted 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.

J. Nat. Cancer Inst., 37, 353-364 (1966).

A.C. RITCHIE and H. SHINOZUKA

Epidermal carcinogenesis in the mouse skin induced by application of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene followed by croton oil.

J. Nat. Cancer Inst., 38, 573-579 (1967).

F.J.C. ROE

The development of malignant tumors of mouse skin after initiating and promoting stimuli. I - The effect of a single application of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) with and without subsequent treatment with croton oil.

Brit. J. Cancer, 10, 61-69 (1956).

E.A. SAXEN

Squamous cell adenocarcinoma of the forestomach in X-irradiated mice fed 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene with a note on failure to induce adenocarcinoma.

J. NAt. Cancer Inst., 13, 441-454 (1952).

.../...

E. SAXEN, P. EKWALL and K. SETALA

Squamous cell carcinoma of the forestomach in mice, following oral administration (canula feeding) of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene solubilized in an aqueous solution of an association colloïd.

Acta. Path. Microb. Scand., 27, 270-275 (1950).

E. SAXEN, P. EKWALL and K. SETALA

On the carcinogenic activity of intragastric administred 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene in mice when solutions of association colloïds are used as solvants.

Acta. Path. Microb. Scand., 27, 914-928 (1950).

F.A. SCHMID, R.C. PENA, W. ROBINSON and G.S. TARNOWSKI

Toxicity of intreperitoneal injection of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene in inbred mice.

Cancer Res., 27, 558-562 (1967).

K. SETALA and P. EKWALL

Penetration of benzpyrene into the stomach wall of mouse.

Science, 112, 229-231 (1950).

L.M. SHABAD

Blastomogenic substances in human environment and principles of prevention.

Acta. Unio Contra Cancrum, 3, 3/4, XIX, 458-459 (1963).

.../...

L.M. SHABAD

The chain of circulation of carcinogenic hydrocarbons in human environment.

9e Congrès International du Cancer, Tokyo (1966).

L.M. SHABAD and L.N. PYLEV

Morphological lesions in rat lungs induced by polycyclic hydrocarbons.

Morphology of experimental respiratory carcinogenesis.

U.S.A. Atomic Energy Commission Division of Technical Information Extension I, 227-245 (1970).

M.J. SHEAR

Studies in carcinogenesis V - Methylderivatives of 1,2-benzanthracene.

Amer. J. Cancer, 33, 499-537 (1938).

M.B. SHIMKIN, M. GRUENSTEIN, D.R. MERANZE, M. ACUFF and D. THATCHER

The effects of schedule and dose of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene on the induction and growth of mammary carcinomas in sprague Dawley female rats.

Cancer Res., 29, 503-505 (1969).

G. SHKLAR

Cortisone and hamster buccal pouch carcinogenesis.

Cancer Res., 26, 2461-2463 (1966).

P. SHUBIK

The growth potentialities of induced skin tumors in mice. The effect of different methods of chemical carcinogenesis.

Cancer Res., 10, 713-717 (1950).

.../...

P. SHUBIK and A.C. RITCHIE

Epidermal carcinogenesis in the mouse induced by one, two or three applications of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene followed by repeated applications of croton oil. A new hypothesis of the mechanism of carcinogenesis.

Cancer Res., 13, 343-346 (1953).

P. SHUBIK, G. PIETRA and G. DELLA PORTA

Studies of skin carcinogenesis in the syrian golden hamster.

Cancer Res., 20, 100-105 (1960).

S. SILBERMAN and G. SHKLAR

The effect of a carcinogen (DMBA)applied to the hasmter's buccal pouch in combination with croton oil.

Oral. Surg. Oral. Med. and Oral. Path., 16, 1544-1555 (1963).

P. SIMS

The metabolism of some aromatic hydrocarbons by mouse embryo cell cultures.

Biochem. Pharm., 19, 285-297 (1970 a).

P. SIMS

Qualitative and quantitative studies of the metabolism of a serie of aromatic hydrocarbons by rat liver preparations.

Biochem. Pharm., 19, 795-818 (1970 b).

P. SIMS

Studies on the metabolism of 7-methylbenz(a)anthracene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and its hydroxymethyl derivatives in rat liver and adrenal homogenates.

.../...

Biochem. Pharm., 19, 2261-2275 (1970 c).

P. SIMS and P.L. GROVER

Quantitative aspects of the metabolism of 7,12-dimethylbenz(a) anthracene by liver homogenates from animals of different age, sex and species.

Biochem. Pharm., 17, 1751-1758 (1968).

H.L. STEWART and E. LORENZ

Morbid anatomy, histopathology and histopathogenesis of forestomach carcinoma in mice fed carcinogenic hydrocarbons in oil emulsions.

J. Nat. Cancer Inst., 10, 1, 147-166 (1949).

B. TOTH

The induction of malignant lymphomas and other tumors by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in the syrian golden hamster.

Cancer Res., 29, 1476-1484 (1969).

B. TOTH, H. RAPPAPORT and P. SHUBIK

Influence of dose and age on the induction of malignant lymphomas and other tumors by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in swiss mice.

J. Nat. Cancer Inst., 30, 723-741 (1963).

B. TOTH and P. SHUBIK

Toxic effects of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in new-born and adult swiss mice.

Nature, 211, 428-429 (1966).

.../...

R. TRUHAUT

Sur les risques de cancérisation pouvant résulter de l'incorporation volontaire ou fortuite d'agents chimiques aux aliments
Acta Unio Int. Contra Cancrum, 3/4, XIX, 472-476 (1963).

S.D. VESSELINOVITCH and P.P.W. GILMAN

Factors modifying experimental epidermal carcinogenesis in mice.
Cancer Res., 17, 52-55 (1957).

M.A. WALTERS

The induction of lung tumors by the injection of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) into new-born suckling and young adulte mice.
Brit. J. Cancer, XX, 148-160 (1966).

M.A. WALTERS and F.J.C. ROE

The time of appearence of lung tumor in mice injected when newly born with 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene.
Brit. J. Cancer, 20, 161-167 (1966).

L.W. WATTENBERG, J.L. LEONG and P. STRAND

Benzpyrène hydroxylase activity in the gastrointestinal tract.
Cancer Res., 22, 1120-1125 (1962).

L.W. WATTENBERG, J.L. LEONG and R.R. GALBRAITH

Induction of increased benzpyrene hydroxylase activity in pulmonary tissue in vitro.
Proc. Soc. Exp. Biol., 127, 467-469 (1968).

.../...

D.N. WHEATLEY, I.R. KERNOHAN and A.R. CURRIE

Liver injury and prevention of adrenal necrosis from 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene in rats.

Nature 211, 387-389 (1966).

D.N. WHEATLEY and M.S. INGLIS

Mammary tumors induced in sprague Dawley female rats by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and its hydroxymethylderivatives.

Brit. J. Cancer, 22, 122-127 (1968).

D.N. WHEATLEY and P. SIMS

Comparaison of the efficacy of pretreatment protection against adrenal necrosis induced by 7-hydroxymethyl-12-methylbenz(a)-anthracene and by 7-methyl-12-hydroxymethylbenz(a)anthracene in rats.

Biochem. Pharm. 18, 2583-2587 (1969).

J. WHITE and H.L. STEWART

Intestinal adenocarcinoma and intraabdominal hemangioendothelioma in mice ingesting methylcholanthrene.

J. Nat. Cancer Inst., 3, 331-347 (1942).

R. WIEDER, D. THATCHER and M.B. SHIMKIN

Levels of 3-methylcholanthrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in rat mammary fat pads after intragastric administration, and relationships to carcinogenic response.

J. Nat. Cancer Inst., 38, 959-967 (1967).

.../...

E.L. WYNDER and D. HOFFMANN

Tobacco and Tobacco smoke.

Acad. Press. New-York, 330 (1967).